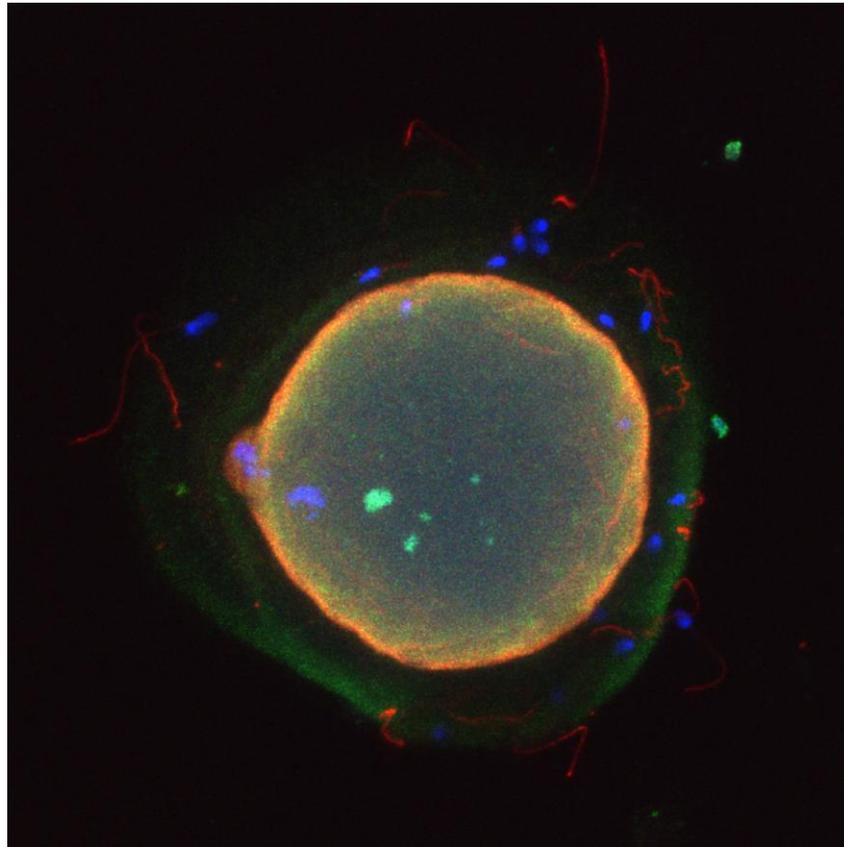




*UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR*

ESTUDIO DE LOS COFACTORES DE LA TUBULINA EN GAMETOS HUMANOS



**M^a Victoria Jiménez Moreno
Santander, Febrero 2015**

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Medicina
Universidad de Cantabria



ESTUDIO DE LOS COFACTORES DE LA TUBULINA EN GAMETOS HUMANOS

Memoria presentada por la Lda. M^a Victoria Jiménez
Moreno para aspirar al título de Doctor por la
Universidad de Cantabria

Directora de Tesis

Dra. Mónica López Fanarraga
Profesora Titular de Bioquímica y Biología
Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria

Santander, Febrero 2015

Dña Mónica López Fanarraga, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria

CERTIFICA: que Dña. M^a Victoria Jiménez Moreno ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título “Estudio de los cofactores de la tubulina en gametos humanos”

Considero que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como memoria de doctorado por el interesado, al objeto de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, Febrero de 2015

*Dedicada a mis padres
por enseñarme a tener ilusiones
y a perseguir mis sueños*

Agradecimientos

La realización de esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin todas aquellas personas que se han cruzado en mi camino tanto a nivel profesional como personal y que han contribuido a ella con su granito de arena, incluidos todos los pacientes que de forma altruista y voluntaria me han donado su material biológico sin el cual no podría haber realizado este estudio.

En primer lugar quiero dar las gracias a mi directora de tesis, Mónica López Fanarraga, por toda la paciencia, dedicación y conocimientos científicos que has compartido conmigo. Por enseñarme a pensar de forma científica y hacerme razonar cada una de las dudas, preguntas o respuestas que te he realizado durante estos años. Pero sobre todo me gustaría agradecerte que nunca hayas perdido la esperanza en mí y por enseñarme a entender el mundo de la investigación con esa “*ilusión*” que tú “*nunca pierdes*” aunque las cosas no vayan bien y que también aplicas en tu vida personal.

Agradecer a Juan Carlos Zabala el hecho de abrirme las puertas al mundo de los cofactores de la tubulina y permitirme trabajar en sus laboratorios. También quiero dar las gracias a Juan Carlos Villegas y a Ekaitz Agirregoitia por su inestimada ayuda y generosidad en su trabajo de microscopia electrónica y PCR respectivamente.

A Luis Buelta por ayudarme a perseguir mi sueño de realizar la tesis y por su dedicación y paciencia conmigo en mis primeros años de cursos de Doctorado y Suficiencia investigadora. Gracias por esos cafés anuales recordándome que tenía que acabar la tesis, al final surtieron su efecto.

También me gustaría dar las gracias a Lorena porque sin todas las horas que has dedicado a enseñarme las técnicas bioquímicas e informáticas, hoy no estaría escribiendo estos agradecimientos. Gracias por tu generosidad, tus consejos, tu sinceridad en nuestras largas conversaciones, por los buenos momentos, y las comidas de los sábados entre gel y gel. Espero que no perdamos nunca estas buenas costumbres. A Laura y a Gerardo por la acogida cariñosa y toda la ayuda que me habéis prestado y todo lo que me habéis enseñado desde el primer momento que llegue al laboratorio. Gracias a los tres por devolverme parte de la ilusión en el trabajo que había perdido por el camino.

Gracias a mis compañeros de la Unidad de Reproducción Asistida y del hospital, por compartir conmigo tantos años de duro trabajo, darme vuestra ayuda para poder realizar mi tesis incluso cuando ha supuesto aumentar vuestra carga laboral y por no perder nunca la ilusión aunque a veces nos hayamos visto en situaciones difíciles. En especial a Cristina y a Elena por recordarme en los momentos bajos que todo esfuerzo lleva su recompensa.

A Lourdes y Abel, gracias por revisar mi tesis y corregir mis errores en el campo de la reproducción y porque junto con Josu y Marina lo que empezó como una relación profesional se ha convertido en una relación de amistad.

A todos mis amigos, por la paciencia que habéis tenido conmigo siempre y en especial estos últimos años que os he tenido un poco desatendidos. Gracias por escucharme, ayudarme a ser mejor persona, darme buenos consejos y sobre todo por hacerme reír siempre que lo necesito.

A Tere, Begoña y vuestras familias, por ser mi hogar en Cantabria. Desde el primer momento que llegue a Santander, habéis cuidado de mí, habéis sido mi refugio donde llorar, reír, desahogarme y siempre me habéis apoyado en todo. Así que solo puedo deciros “*GRACIAS*” por formar parte de mi vida.

A mis hermanos por ser lo mejor que tengo junto con sus familias y mis padres. Quiero daros las gracias por compartir conmigo vuestras vidas y a mis cuñados por tratarme como a una hermana. A todos vosotros por transmitir el cariño que me tenéis a vuestros hijos a los que adoro y a pesar de la distancia hablan de mí como si me vieran todos los días. A mis 11 sobrinos porque ser los responsables de la sonrisa con la que me levanto cada mañana y a mi sobrina Ana por ayudarme con el índice de la Tesis. Al resto de mi familia, porque es muy fácil vivir sabiendo que tengo tanta gente que me quiere y me apoya.

Me gustaría dedicar mis últimas palabras a mis padres, por darme y enseñarme a vivir la vida con ilusión, por mostrarme con vuestro ejemplo lo que significa ser buenas personas y a intentar hacer las cosas lo mejor posible respetando a los demás. Gracias por todas las cosas que os habéis dejado en el camino por ayudarme a cumplir mis sueños. Y no sé cómo serán el resto de los padres, pero lo que sí que se dé fijo es que los míos son los “*mejores*” padres que me podían haber tocado.

INDICE

I	ABREVIATURAS	2
II	INDICE FIGURAS Y TABLAS	7
II.1	Introducción:.....	8
II.2	Materiales y métodos:.....	9
II.3	Resultados:.....	10
II.4	Discusión:	12
III	INTRODUCCIÓN	13
III.1	El citoesqueleto:.....	14
III.2	Los microtúbulos:.....	15
III.2.1	Estructura.....	15
III.2.2	Nucleación de los MT.....	17
III.2.3	Dinámica de los MTs.....	17
III.2.4	Estructuras celulares compuestas por MTs	19
III.3	Tubulinas:	20
III.3.1	Estructura de la tubulina.....	21
III.3.2	Diversidad en tubulina α y β	21
III.3.3	Síntesis de tubulina.....	22
III.3.4	Plegamiento de tubulina y formación del heterodímero	22
III.4	Los Cofactores del plegamiento de la tubulina:.....	26
III.4.1	Cofactor A	26
III.4.2	Cofactor B	28
III.4.3	Cofactor C.....	30
III.4.4	Cofactor D.....	31
III.4.5	Cofactor E	32
III.4.6	ARL2.....	34
III.5	LOS MTs EN LA MITOSIS Y LA MEIOSIS:.....	36
III.6	Los MTs en gametos humanos:	40
III.6.1	Espermatozoides:	40
III.6.2	Espermatozoide maduro	49
III.6.3	Ovocitos:	53
IV	OBJETIVOS	70
V	MATERIALES Y MÉTODOS	72
V.1	Materiales:	74
V.1.1	Soluciones, reactivos y fármacos:.....	74
V.1.2	Material biológico:.....	78
V.2	Métodos:.....	83
V.2.1	Western blot.....	83

V.2.2	<i>RT-PCR</i>	85
V.2.3	<i>Microscopía Electrónica</i>	88
V.2.4	<i>Inmunomicroscopía Electrónica</i>	88
V.2.5	<i>Inmunofluorescencia</i>	88
V.2.6	<i>Estudios de SNPs en sangres de pacientes de la URA</i>	91
VI	RESULTADOS	106
VI.1	<i>Estudios Bioquímicos:</i>	107
VI.1.1	<i>Estudio de la expresión de proteínas mediante Western blot:</i>	107
VI.1.2	<i>Estudio de la expresión del ARNm mediante RT-PCR:</i>	109
VI.2	<i>Localización de TBCD en tejido testicular:</i>	112
VI.2.1	<i>Microscopía electrónica:</i>	112
VI.2.2	<i>Técnicas de Inmunomicroscopía electrónica</i>	116
VI.3	<i>Localización de los TBCs mediante inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal:</i>	118
VI.3.1	<i>Inmunofluorescencia en espermatozoides</i>	118
VI.3.2	<i>Inmunofluorescencia en ovocitos</i>	123
VI.4	<i>Evaluación de haplotipos ligados al “Síndrome del enfermo de los cofactores de la tubulina” en pacientes con problemas de fertilidad:</i>	135
VII	DISCUSIÓN	137
VIII	CONCLUSIONES	151
IX	ESTUDIOS FUTUROS	154
X	BIBLIOGRAFIA	156

I ABREVIATURAS

Ad: Espermatogonias oscuras

ADN: Acido desoxirribonucleico

AG: Aparato de Golgi

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico

Ap: Espermatogonias pálidas

ARFs: Factores de ribosilación del ADP, del término inglés “*ADP ribosylation factors*”

Arl2: Proteina similar a ARF, del término inglés “*ARF- like protein*”

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosin trifosfato

BMP15: Factor morfogenético del hueso, del término inglés “*Bone morphogenetic protein*”

BSA: Seroalbúmina bovina

CCT: Chaperonina citosólica con TCP-1, del término inglés “*Cytosolic chaperonin containing TCP-1*”

Células HeLa: Línea de células endoteliales de carcinoma cervical-uterino

Células Hek293T: Línea de células 293 embrionarias de riñón

Células MCF7: Línea celular de adenocarcinoma de mama humano

Células NIH3T3: Línea celular de fibroblastos de embrión de ratón

CeGen: Centro Nacional de Genotipado

CGs: Células de la granulosa

CGPs: Células germinales primordiales

CNBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica Norteamericana

CP: Corpúsculo polar

C-Terminal: Carboxilo terminal

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

Fases G1 y G2: Fases de crecimiento durante el ciclo celular

Fases S: Fase de síntesis durante el ciclo celular

FIV: Fecundación *in vitro* clásica

FSH: Del término inglés “Follicle-stimulating hormone”

GDF9: Factor de diferenciación del crecimiento, del término inglés “*Growth differentiation factor*”

GDP: Guanosín difosfato

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GTP: Guanosín trifosfato

GVBD: Rotura de la vesícula germinal, del término inglés “Germinal vesicle breakdown”

HCL: Ácido clorhídrico

HRD: Hipoparotidismo, retraso mental y dismorfia facial

ICSI: Microinyección intracito`plasmática, del término inglés “*Intracytoplasmatic sperm inyecction*”

IFT: Transporte intraflagelar, del término inglés “*intraflagelar transport*”

IMT: Transporte intramanchette, del término inglés “*intramanchette transport*”

KDa: Kilo Daltons

LH: Hormona Luteinizante, del término inglés “*Luteinizing hormone*”

MAPs: Proteínas kinasas

MAPK: Proteína kinasa

MPF: Factor promotor de meiosis, del término inglés “*M-phase factor*”

MI: Metafase I de la meiosis

MII: Metafase II de la meiosis

MT: Microtúbulo

MTOC: Centro organizador de microtúbulos, del término inglés “*Microtubule Organazing Center*”

NuMA: Aparato mitótico nuclear, del término inglés “*Nuclear Mitotic Apparatus*”

N-terminal: Amino terminal

OPRM1: el receptor μ de opioides, del término inglés “ μ -opioid receptor”, OPRM1

PCM: Material pericentrosomal, del término inglés “Pericentrosomal material”

P150: Subunidad del complejo activador de dineina

PI: Profase I de la meiosis

RE: Retículo endoplasmático

RCC1: Factor regulador de la condensación de la cromatina

SAC: Punto de control de la formación del huso, del término inglés “*Spindle Assembly Checkpoint*”

SDS: Dodecilsulfato sódico

SNP: Poliformismo de nucleótido simple, del término inglés “*Single Nucleotide Polimorphism*”

SPZ: Espermatozoide

URA: Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Universitario Marques de Valdecilla

TBCA: Cofactor de la tubulina A, del término inglés “*Tubulin cofactor A*”

TBCB: Cofactor de la tubulina B, del término inglés “*Tubulin cofactor B*”

TBCC: Cofactor de la tubulina C, del término inglés “*Tubulin cofactor C*”

TBCD: Cofactor de la tubulina D, del término inglés “*Tubulin cofactor D*”

TBCE: Cofactor de la tubulina E, del término inglés “*Tubulin cofactor E*”

TBCs: Cofactores del plegamiento de la tubulina, del término inglés “*Tubulin cofactors*”

TBCEL: Proteína similar a TBCE, del término inglés “*cofactor E-like*”

TBST milk: Buffer Tris salino con Tweed + 3% de leche desnatada en polvo

TGF β : Factor de crecimiento transformante β , del término inglés “*Transforming growth factor beta*”

TEMED: Tetrametilenediamina

TRA: Técnicas de reproducción asistida

TriC: Complejo del anillo TCP-1, del término inglés “*TCP-1 ring complex*”

UBL: Dominio similar a la Ubiquitina, del término inglés “*Ubiquitin like domain*”

URA: Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

VG: Vesícula germinal

ZP: Zona pelúcida

γ -TuRCs: Anillo de γ -tubulina, del término inglés “ *γ -tubulin ring complex*”

2PN2CP: Dos pronúcleos (PN pronúcleo, dos corpúsculos polares)

II INDICE FIGURAS Y TABLAS

II.1 Introducción:

Fig.I-1: A: Imagen electrónica del citoesqueleto. B: Esquema de las diferentes fibras principales que componen el citoesqueleto de una célula eucariota.

Fig.I-2: Esquema de la estructura de los MTs.

Fig.I-3: Esquema de la inestabilidad dinámica microtubular.

Fig.I-4: Esquema de la estructura de un con los MTs formando tripletes.

Fig.I-5: Modelo de la dimerización de la tubulina en la ruta postchaperonina.

Fig.I-6: Modelo de disociación del dímero de tubulina.

Fig.I-7: Estructura tridimensional de TBCA humano.

Fig.I-8: Estructura del gen de TBCA humano.

Fig.I-9: Esquema de TBCE.

Fig.I-10: Esquema del gen de TBCB.

Fig.I-11: Esquema de TBCC.

Fig.I-12: Esquema del gen de TBCC.

Fig.I-13: Inmunolocalización por microscopía confocal de TBCD en los centrosomas y en el midbody en células HeLa.

Fig.I-14: Esquema del gen TBCD.

Fig.I-15: Esquema de TBCE.

Fig.I-16: Esquema del gen de TBCB.

Fig.I-17: Esquema de ARL2.

Fig.I-18: Esquema del gen de TBCC.

Fig.I-19: Esquema comparativo de Meiosis y Mitosis.

Fig.I-20: Dos esquemas diferentes sobre la proliferación de las espermatogonias.

Fig.I-21: Esquema general de la espermatogénesis.

Fig.I-22: Esquema representativo del proceso de espermiogénesis.

Fig.I-23: Esquema del acroplaxoma y su anillo marginal.

Fig.I-24: Esquema de los cambios que experimenta el citoesqueleto durante la espermatogénesis.

Fig.I-25: A. Esquema de las partes de un espermatozoide maduro. B. Esquema de la ultraestructura del flagelo del espermatozoide.

Fig.I-26: Esquema del proceso de fecundación a nivel del centrosoma del espermatozoide.

Fig.I-27: A. Esquema de ovario donde se observa la presencia de folículos en diferentes estadios de crecimiento en el córtex del ovario.

Fig.I-28: Esquema resumen de las diferentes fases de la foliculogénesis.

Fig.I-29: A. Esquema de la comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa a través de las uniones tipo gap.

Fig.I-30: Esquema de un folículo de Graaf.

Fig.I-31: Foto y esquema representativo de un PI

Fig.I-32: Foto y esquema representativo de un MI

Fig.I-33: Fotos de inmunofluorescencia realizadas con Microscopia Confocal.

Fig.I-34: Fotos y esquema representativo de un MII

Fig.I-35: Esquema representativo de las etapas del proceso de fecundación.

II.2 Materiales y métodos:

Fig.M-1: Imagen de una ecografía vaginal de unos ovarios estimulados con gonadotropinas.

Fig.M-2: Esquema de los Protocolos de Estimulación Ovárica.

Fig.M-3: Esquema resumen de las Técnicas de Fecundación in vitro (TRA).

Fig.M-4: Esquema de los 4 pasos necesarios para realizar eclosión mecánica

Fig.M-5: Esquema de las TRA.

Fig.M-6: Esquema representativo de alguna de las posibilidades de combinaciones que se van o poder observar en los ovocitos en MII al realizar el análisis de las inmunofluorescencia al Microscopio Confocal.

Fig.M-7: Haplotipos seleccionados utilizando el HapMap y esquema de cada gen de TBCs con la ubicación de sus respectivos SNPs.

Tabla M-1: Ciclos necesarios para la síntesis de ADNc

Tabla M-2: Primers utilizados para realizar las RT-PCRs

Tabla M-3: Comparación filogenética de los TBCs en diferentes especies utilizando como herramienta HomoloGene.

Tabla M-4: Haplotipos seleccionados utilizando el HapMap y esquema de cada gen de TBCs con la ubicación de sus respectivos SNPs

Tabla M-5: Tabla resumen de todos los SNPs (codificantes y tagging) seleccionados utilizando el HapMap para diseñar el Chip de ADN.

II.3 Resultados:

Fig.R-1: Detección de TBCE, TBCD, α - y β - tubulina mediante técnicas de western blot con anticuerpos específicos.

Fig.R-2: Detección de la presencia de los ARNm para los TBCs, β - tubulina y β -actina en espermatozoides y córtex cerebral.

Fig.R-3: Detección de la presencia de los ARNm para los TBCs, β - tubulina y β -actina en ovocitos (PI, MI y MII) y córtex cerebral.

Fig.R-4: Micrografía electrónica de una espermátida en fase temprana de formación.

Fig.R-5: Micrografía electrónica de secciones oblicuas de espermátidas alargada.

Fig.R-6: Micrografía electrónica de un espermatozoide maduro

Fig.R-7: Análisis mediante inmunoelectrónica de la presencia de TBCD en tejido testicular en una espermátida durante el proceso de espermiogénesis.

Fig.R-8: Análisis mediante inmunoelectrónica de la presencia de TBCE en tejido testicular de ratón durante el proceso de espermatogénesis.

Fig.R-9: Imágenes de microscopía confocal de espermatozoides humanos donde se detecta TBCD por inmunofluorescencia.

Fig.R-10: Imagen de microscopía confocal detallada de un espermatozoide con ampliación de la zona de localización de los s.

Fig.R-11: Imágenes de microscopía confocal de espermatozoides humanos donde se detecta TBCE por inmunofluorescencia.

Fig.R-12: Imágenes de microscopía confocal de espermatozoides humanos donde se detecta TBCE por inmunofluorescencia.

Fig.R-13: Imágenes de microscopía confocal de proyecciones en el eje Z en ovocitos humanos en VG donde se detecta TBCD por inmunofluorescencia.

Fig.R-14: Imágenes de microscopía confoca de proyecciones en el eje Z en ovocitos humanos en MI donde se detecta TBCD por inmunofluorescencia.

Fig.R-15: Imágenes de microscopía confocal de proyecciones en el eje Z de ovocito humanos en MII donde se observa por un lado los cromosomas dispuestos en el huso y por otro el CP

Fig.R-16.1: Imágenes de microscopía confocal de proyecciones en el eje Z de ovocitos humanos en MII donde se detecta TBCD por inmunofluorescencia.

Fig.R-17.1: Imágenes de microscopía confocal de proyecciones en el eje Z de ovocitos humanos en PI donde se detecta TBCE por inmunofluorescencia.

Fig.R-17.2: Imágenes de microscopía confocal de proyecciones en el eje Z de ovocitos humanos en PI donde se detecta TBCE por inmunofluorescencia.

Fig.R-18: Imágenes de microscopía confocal de proyecciones en el eje Z de ovocitos humanos en MI donde se detecta TBCE por inmunofluorescencia.

Fig.R-19.1: Imágenes de microscopía confocal de proyecciones en el eje Z de ovocitos humanos en MII donde se detecta TBCE por inmunofluorescencia.

Fig.R-19.2: Imágenes de microscopía confocal de proyecciones en el eje Z de ovocitos humanos en MII donde se detecta TBCE por inmunofluorescencia.

Fig.R-20: Imágenes de microscopía confocal de proyecciones en el eje Z en un MII microinyectado y que no ha sido capaz de completar el proceso de fecundación y donde se detecta TBCE por inmunofluorescencia.

Fig.R-21: Esquema resumen de la ubicación del cambio en el SNPs RS378522 detectado en homocigosis en una paciente de la URA en el mapa del gen de TBCD.

II.4 Discusión:

Fig.D-1: Esquema resumen de la localización subcelular de TBCD y TBCE en gametos humanos.

Fig.D-2: Esquema resumen de las posibles funciones y localizaciones subcelular de TBCD y TBCE en el proceso de fecundación y primeras divisiones celulares

III INTRODUCCIÓN

III.1 El citoesqueleto:

El citoesqueleto es un entramado tridimensional y dinámico, presente en eucariotas, bacterias, arqueas (Yutin y Koonin, 2012) y en algunos fagos (Kraemer y col, 2012). Actúa como mediador esencial en muchos aspectos de la función celular ya que contribuye a establecer la forma celular, organizar la disposición y comunicación de los orgánulos celulares y participa en los procesos de endocitosis, exocitosis y división celular. Está constituido por una compleja malla de filamentos proteicos que cooperan entre sí, permitiendo al citoesqueleto modificar su configuración espacial en respuesta a cambios microambientales que influyen en la conducta y dinámica de las células (Charbon y cols, 2009) tales como la diferenciación, la proliferación, la supervivencia, la polaridad y la migración (Hynes, 2009).

En las células eucariotas, está integrado principalmente por tres tipos de filamentos con propiedades mecánicas y dinámicas propias: microtúbulos (MTs), filamentos de actina y filamentos intermedios. Estas fibras se originan a partir de la polimerización de cada uno de sus monómeros unidos mediante enlaces no covalentes. Cada tipo de hebra está formado por una subunidad proteica distinta: actina para los filamentos de actina, tubulina para los MTs y una familia de proteínas fibrosas relacionadas (ej. vimetina o láminas) para los filamentos intermedios (Alberts, 2003).

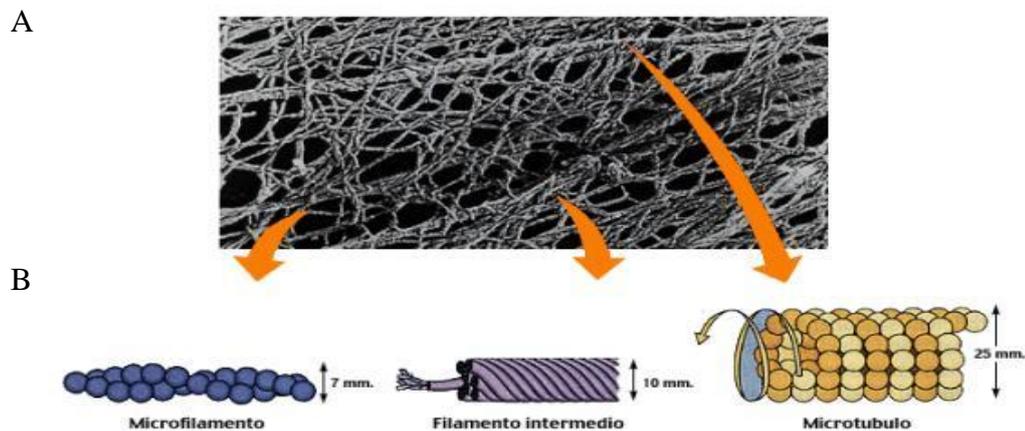


Fig.I-1: A: Imagen electrónica de barrido del citoesqueleto. B: Esquema de las diferentes fibras que componen el citoesqueleto de una célula eucariota. Microfilamentos de actina, Filamentos intermedios y MTs. (http://www7.uc.cl/sw_educ/biologia/bio100/html/portadaM1val2.4.6.html).

Los microfilamentos de actina son necesarios para la movilidad, la división celular y la contracción de la célula. Los filamentos intermedios distribuyen fuerzas de tensión y proporcionan soporte estructural a los diferentes orgánulos, mientras que los MTs participan en el establecimiento de la polaridad celular y en los procesos de motilidad (cilios y flagelos), división y transporte.

III.2 Los microtúbulos:

III.2.1 Estructura

Los **microtúbulos (MTs)** son estructuras tubulares de 25 nm de diámetro exterior y unos 12 nm de diámetro interior, con longitudes que pueden ir desde unos pocos nanómetros a varios micrómetros (Amos y Baker, 1979). Son polímeros formados por heterodímeros de subunidades globulares de α - y β -tubulina que conforman la unidad estructural y funcional del microtúbulo (Weisenberg, 1972).

Las interacciones longitudinales y laterales entre los heterodímeros de α - y β -tubulina van a dar lugar a la formación del MT. Por un lado, las uniones longitudinales de tipo “cabeza-cola” entre la α -tubulina de un heterodímero y la β -tubulina del siguiente heterodímero, van a facilitar la formación de unas estructuras lineales denominadas **protofilamento**. Y por otro lado, las uniones laterales entre las α - y β -tubulinas de protofilamentos contiguos, dan lugar primero a láminas que posteriormente se curvan y cierran a modo de cremallera (Nogales y Wang, 2006) alrededor de un núcleo central (Alberts y col, 1993) dando lugar a un MT. *In vitro*, el número de protofilamentos que forman un microtúbulo varía desde 9 hasta 16 (Chretien y Wade, 1991) mientras que *in vivo* habitualmente están compuestos por 13 protofilamentos (Evans y cols, 1985), lo que sugiere la existencia de un mecanismo de control que define una única geometría (Tinley y col, 1973; Sui y Downing, 2010).

El patrón molecular intrínseco de las repeticiones de los dímeros de tubulina y su organización a lo largo de los protofilamentos de tipo "cabeza-cola" resultando en una polaridad a lo largo del polímero de tubulina, que da lugar a la formación de dos extremos diferentes. (McKean y col. 2001). El extremo (+) está compuesto por un anillo de β -tubulinas (Walter y col, 1988) y presenta unas tasas de crecimiento y disociación

mayores que el extremo (-) que está compuesto por un anillo de α -tubulinas (Fig. I-2) y normalmente está localizado en un centro organizador de microtúbulos (MTOC, del término inglés “*Microtubule Organizing Center*”) (McKean y col. 2001, Li y col, 2002).

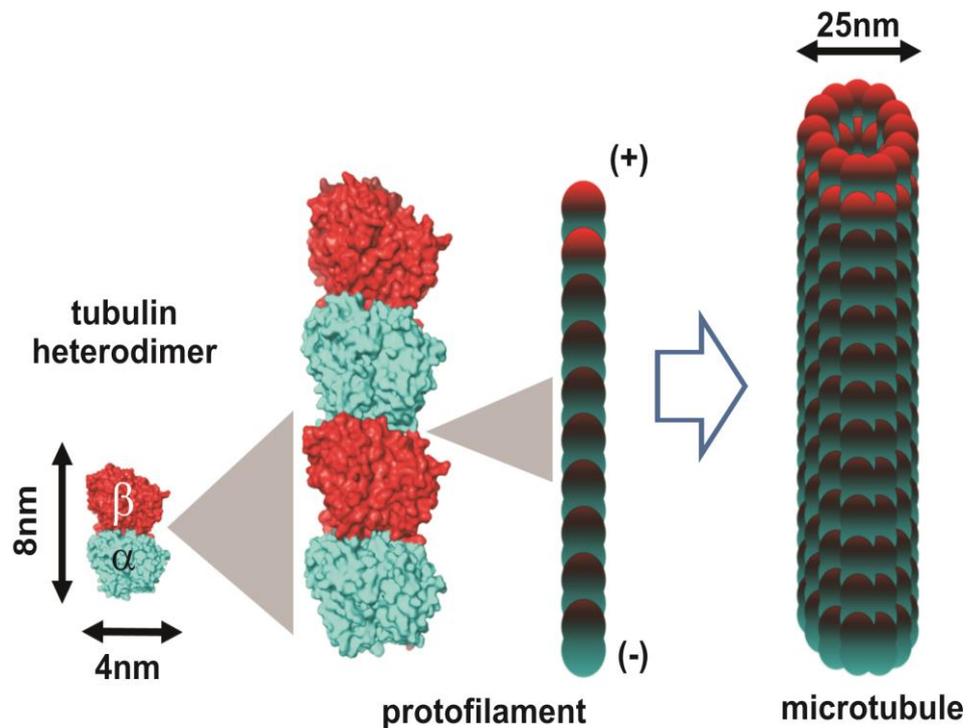


Fig.I-2: Esquema de la estructura de los MTs. Están formados por la interacción de una proteína compuesta por dos polipéptidos proteínas diferentes, la α -tubulina (verde) y la β -tubulina (rojo). La asociación lineal de los heterodímeros de $\alpha\beta$ - tubulina forma un protofilamento así como la asociación lateral de protofilamentos forma un MT con polaridad. El extremo - es el menos dinámico y siempre comienza con una subunidad de α -tubulina y el extremo + es el mas dinámico y termina con un anillo de subunidades de β -tubulina (García Hevia y col, 2014).

Existen numerosos genes de tubulinas en el genoma y numerosos pseudogenes. Dado que los dímeros de $\alpha\beta$ -tubulinas se pueden formar como combinaciones de cualquiera de sus productos, cualquier α - con cualquier β -tubulina, la combinación entre estas diferentes tubulinas hace que los MTs puedan mostrar una enorme variedad a nivel molecular que se traduce en una enorme versatilidad funcional. Además, estas proteínas pueden sufrir numerosas modificaciones postransduccionales que amplifican todavía más su capacidad de especialización. En términos generales se pueden distinguir dos poblaciones de MTs. Por un lado se encuentran los MTs estables o de vida larga que forman parte de los cilios, flagelos o axones neuronales y por otro lado los MTs

inestables o de vida corta, que se localizan en estructuras altamente dinámicas como los husos mitóticos y meióticos.

III.2.2 Nucleación de los MT

La formación de los MTs se inicia con una primera fase de nucleación seguida de una fase de crecimiento o elongación de los dímeros de tubulina. Y para que esto ocurra, es necesario que haya presente una concentración mínima de proteína (concentración crítica) por debajo de la cual no existe formación significativa de polímeros, al menos *in vitro* (Oosawa y Asakura, 1975).

El proceso de nucleación consiste en la formación *de novo* de MTs a partir de tubulina. Este proceso puede ocurrir en diferentes ubicaciones intracelulares especializadas, a las cuales Pickett-Heaps (1969) asignó el nombre genérico de centro organizador de MTs (MTOC, del término inglés “*Microtubule Organizing Centers*”). La función de los MTOCs, va a depender del acúmulo de unas estructuras anulares denominadas γ -TuRCs (del término inglés “ *γ -tubulin ring complex*”), compuestas por γ -tubulinas y proteínas asociadas que sirven como molde para el crecimiento de los MTs (Moritz y col, 1995). Dentro de los MTOCs, se encuentran los centrosomas que son el sitio principal de nucleación de los MTs en la célula, los cuerpos basales donde se inicia la formación de los flagelos y cilios y en los husos mitóticos y meióticos o asociados al núcleo.

III.2.3 Dinámica de los MTs

Los MTs presentan un comportamiento intrínsecamente dinámico de polimerización y despolimerización gracias a la capacidad que tienen de intercambiar subunidades de tubulina entre los polímeros y la tubulina soluble. En las células, esta característica les permite realizar sus funciones ya que su dinamicidad cambia en respuesta a diferentes señales reguladoras (tesis Carranza, 2010), dando como resultado, por ejemplo, que los MTs interfásicos sean entre 10 y 20 veces más estables que los mitóticos (Mitchison y Kirschner, 1984a; McNally, 1996), o durante la diferenciación neuronal (Fanarraga y cols, 1999a).

Los extremos del MT poseen diferente tasa de polimerización (Bergen y Borisy, 1980) siendo el extremo + más dinámico ya que su tasa de crecimiento es mayor que el extremo - con una tasa de crecimiento más lenta. Así, un MT puede oscilar entre las

fases de crecimiento/polimerización y acortamiento/despolimerización, también llamadas respectivamente rescate y catástrofe (tesis Carranza, 2010).

Existe una tercera fase denominada “estado estacionario”, que solo se puede aplicar a la población total de MTs y no a un MT en particular ya que sus extremos están continuamente creciendo o acortándose. En esta fase, no se aprecian cambios en la masa total del polímero y se produce cuando el crecimiento de un grupo de MTs se compensa con la despolimerización de otro grupo (Mitchison y Kirschner, 1984a; Mitchison y Kirschner, 1984b).

La inestabilidad dinámica es un proceso que requiere un aporte de energía que procede de la hidrólisis del GTP unido a β -tubulina en el proceso de polimerización. Este GTP es hidrolizado tras la incorporación del heterodímero al MT aunque la velocidad de polimerización, esto es, de incorporación de tubulina al MT, es mayor que la de hidrólisis de GTP (Carlier y Pantaloni, 1981) y este retraso se acentúa con concentraciones altas de tubulina, cuando la tasa de polimerización es mayor. Por lo tanto, la hidrólisis de GTP no está acoplada a la polimerización de tubulina y este retraso genera en el extremo (+) un denominado “cap” (gorra, del término inglés “cap”) formado por subunidades de tubulina unidas a GTP y parece ser el responsable de la estabilidad del MT en crecimiento (Fig.I-3).

In vitro, cuando la concentración de tubulina en el medio es superior a la concentración crítica, el extremo (+) del microtúbulo estará constituido por tubulina unida a GTP y el MT se encontrará en crecimiento, sin embargo cuando la concentración de tubulina en el medio es inferior a la crítica, en el extremo (+) la tubulina aparecerá unida a GDP y el MT se encontrará en proceso de despolimerización. Este acortamiento sucede cuando el MT pierde el GTP-cap y en su extremo (+) encontramos tubulina unida a GDP. Cuando esto ocurre, las interacciones entre protofilamentos se debilitan, los protofilamentos con GDP- β -tubulina tienden a curvarse y, como resultado, el extremo aparece desflechado.

La tubulina unida a GTP es más estable en el MT que la tubulina unida a GDP (Caplow y cols, 1994; Nogales y cols, 1999). Cuando dentro de la célula es necesaria una remodelación rápida de la red microtubular, la hidrólisis de GTP y la consiguiente pérdida del GTP-cap en el extremo del MT causa un cambio conformacional que

debilita las interacciones laterales entre protofilamentos, disociándose rápidamente la tubulina unida a GDP. De la misma manera, se puede volver a formar el GTP-cap adicionando tubulina unida a GTP y estabilizando así el MT, aunque esta situación es poco frecuente. Por lo tanto, la hidrólisis del GTP durante el proceso de polimerización del MT regularía el estado en que se encuentre este último, pudiendo oscilar entre las fases de catástrofe (tubulina-GDP) y rescate (tubulina-GTP) (Mandelkow y cols, 1991).

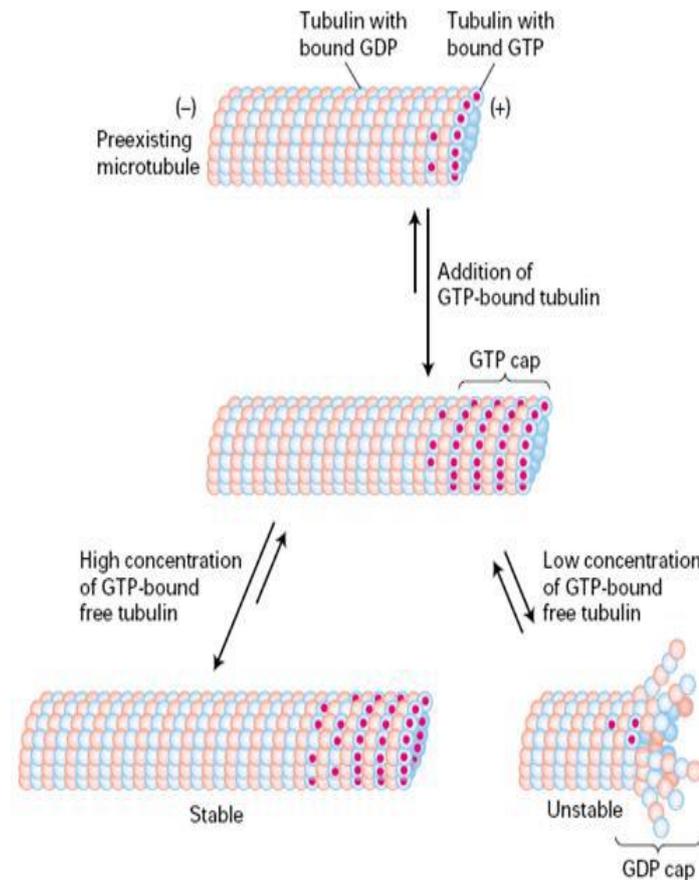


Fig.I-3: Esquema de la inestabilidad dinámica microtubular. Crecimiento y despolimerización del MT (Lodish y cols, 2000).

III.2.4 Estructuras celulares compuestas por MTs

En la célula, los MTs se encuentran localizados en diferentes estructuras que pueden ser muy simples constituidas por un único MT (singlete) o en formaciones más complejas formadas por dos MTs (dobletes), como en los cilios y flagelos (Fisch y Dupuis-Williams, 2011), o tres MTs (tripletes), como en los centrosomas de células animales y los cuerpos basales de los cilios y flagelos (Dawe y col, 2007).

Los dobletes y tripletes están formados por un túbulo A que contiene los 13 protofilamentos de un MT típico (singlete) y un túbulo B y C (en el caso de los tripletes) que contienen solo 10 protofilamentos. Estas formaciones de MTs, se caracterizan por ser estructuras más estables que los singletes ya que poseen una tasa de renovación bastante más lenta que los singletes.

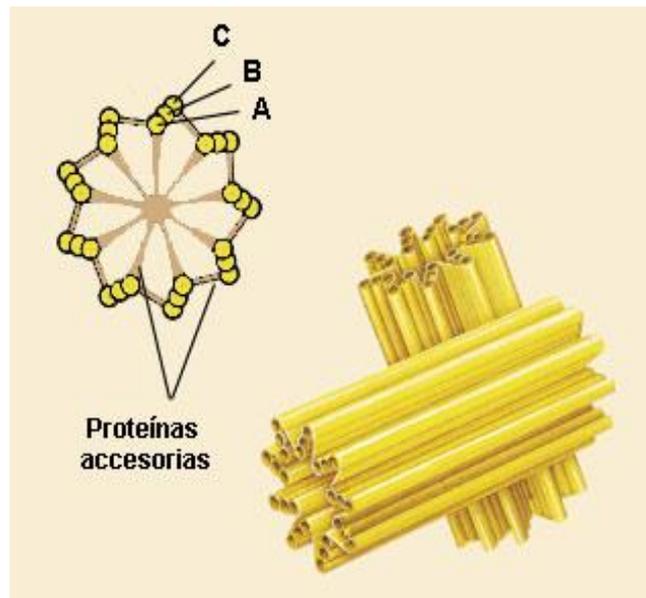


Fig.I-4: Esquema de la estructura de un centriolo con los MTs formando tripletes (<http://rafaeles07.webnode.es/sistemas-membranosos/centriolos/>).

III.3 Tubulinas:

Las tubulinas pertenecen a una superfamilia de proteínas que comprende tanto proteínas eucariotas como procariotas (Nogales y cols, 1998; Inclán y Nogales, 2000). En la actualidad, en eucariotas hay descritas 10 subfamilias de tubulinas: α , β , γ , δ , η , ϵ , ζ , ι , θ y κ entre las que existe una alta tasa de conservación de sus secuencias (Chang y Stearns, 2000; Ruiz y cols, 2000; Chang y Stearns, 2000; Dupuis-Williams y cols, 2002; Dutcher, 2003).

Los genes de las tubulinas α , β y γ existen en el genoma de todos los eucariotas y son esenciales para la polimerización de los MTs. Sin embargo, los genes de las tubulinas δ , ϵ , η , ζ , ι , θ y κ no aparecen en todos los organismos eucariotas por ejemplo ζ sólo se ha encontrado en *Trypanosoma brucei* y ι , θ y κ , solamente en *Paramecium tetraurelia*. De cualquier manera, el alto grado de conservación de esta familia de

tubulinas implica que para conservar las propiedades funcionales de estas proteínas, las mutaciones que se puedan producir en sus secuencias sólo pueden ocurrir en unas pocas posiciones sin producir un efecto deletéreo y que aquellas modificaciones que se hayan conservado sea porque probablemente sean funcionalmente ventajosas o no significativas desde el punto de vista funcional.

III.3.1 Estructura de la tubulina

La tubulina es la unidad estructural y funcional del MT. Se trata de un heterodímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas de α - y β -tubulina, de unos 50 kDa cada una. La estructura de α - y β -tubulina son casi idénticas. Cada monómero de tubulina es un elipsoide compacto con unas dimensiones de 46 x 40 x 65 Å y sus diferencias se limitan a la longitud y conformación de algunos giros, a pequeñas diferencias en algunos elementos de estructura secundaria y a algunas zonas de densidad diferente debido a las cadenas laterales de aminoácidos distintos.

El núcleo de su estructura lo constituyen dos hojas β de seis y cuatro cadenas respectivamente, flanqueadas por doce hélices α . La estructura del monómero es muy compacta y tienen un dominio carboxilo terminal (C-terminal) donde los últimos 20 residuos de esta zona se caracterizan porque son muy variables, sufren modificaciones postraduccionales y determinan el isotipo de la tubulina. Esta zona se encuentra accesible a proteasas, anticuerpos y MAPs.

III.3.2 Diversidad en tubulina α y β

En vertebrados, se han descrito al menos 10 genes que codifican para cada tipo de tubulina (Janke y Bulinski, 2012), cuyos productos se diferencian fundamentalmente en su extremo C-terminal (Sullivan y col, 1986) y muestran una distribución específica en los distintos tejidos (Kopczak y cols, 1992; Matthews y cols, 1993) que permite optimizar la función de los MTs en células u orgánulos especializados. Por ejemplo en el ratón, la α_1 se expresa sobre todo en cerebro y pulmón mientras que la $\alpha_{3/7}$ es específica de testículo así como β_2 se expresa mayoritariamente en cerebro y β_3 es específica de testículo (Lewis y cols, 1985; Villasante y cols, 1986; Wang y cols, 1986).

Por otro lado, los monómeros de α - y β -tubulina pueden sufrir una serie de modificaciones post-traduccionales como acetilaciones, glicosilaciones, glutamilaciones, tiroxinaciones y fosforilaciones, mediante las cuales se generan

múltiples isoformas de tubulina cuyas propiedades funcionales son diferentes. Estas modificaciones suelen tener lugar en el extremo C-terminal (Nogales y col 1999) de tubulinas ya incorporadas a los MTs (Fourest-Lievuvin y col., 2006) y aunque el significado funcional en muchos casos se desconoce, podrían deberse a que difieren en ciertas propiedades que podrían conferir especificidad a los distintos grupos celulares de MTs (Westermann y Weber, 2003; Verhey y Gaertig, 2007, Janke y Bulinski, 2012) originando diferencias en la estabilidad y cinética de ensamblaje de los mismos (Carpenter y cols, 2006) así como en sus propiedades mecánicas (Verhey y Gaertig, 2007) y en la afinidad que tienen las proteínas motoras por ellos, facilitando y regulando, entre otras funciones, el transporte intracelular (Rosenbaum, 2000; Hammond y col, 2010).

III.3.3 Síntesis de tubulina

Las células, disponen de dos sistemas de regulación de la síntesis de estas proteínas, uno de retroalimentación negativo capaz de actuar sobre la estabilidad de los ARN mensajeros (ARNm) de cada monómero de tubulina (Cleveland y col., 1981; Sellin y col., 2008) y un mecanismo de regulación de la propia síntesis de estas proteínas donde la expresión de uno de los monómeros de tubulina condiciona la expresión del otro, tal y como se ha observado cuando la sobreexpresión de β -tubulina induce un incremento en la síntesis de α -tubulina endógena (Gonzalez-Garay y Cabral, 1995).

III.3.4 Plegamiento de tubulina y formación del heterodímero

El plegamiento de proteínas es un proceso por el cual una proteína obtiene su estructura nativa funcional (estructura tridimensional) que es la que capacita a la proteína para llevar a cabo sus diferentes y diversas funciones biológicas. En el caso de α - y β -tubulinas la adquisición de la conformación nativa requiere la ayuda de ciertas chaperonas moleculares ya que las tubulinas constituyen estructuras oligoméricas con un gran número de contactos intra- e intermoleculares, teniendo por tanto una alta probabilidad de generar estructuras no funcionales. Además, la gran similitud estructural de las dos subunidades que componen la tubulina hace necesaria la presencia de cofactores específicos que eviten la unión entre subunidades iguales y las guíen en el encuentro de su pareja.

El proceso de plegamiento de la tubulina ha sido descrito *in vitro* en detalle y puede dividirse en dos fases: una primera en la cual el polipéptido interactúa con la prefoldina y con la chaperonina citosólica (CCT) y una segunda en la que el polipéptido liberado de CCT interactúa con diferentes cofactores proteicos para ensamblar el heterodímero de tubulina a lo largo de la denominada ruta postchaperonina.

III.3.4.1 Primera fase: Interacción con chaperonas

Una vez terminada la síntesis del polipéptido de tubulina, este abandona el ribosoma y es rápidamente capturada por una chaperonina específica de actina y tubulina llamada prefoldina (Martín-Benito y cols, 2002). En eucariotas, está constituida por un complejo heterohexamérico con estructura de pulpo con seis “tentáculos” (Martín-Benito y cols, 2002) formado por seis péptidos con una masa molecular entre 14 y 23 kDa que da lugar a un complejo de 200 kDa.

La prefoldina va a transportar el monómero de tubulina hasta la chaperonina citosólica para que pliegue a dicha proteína. La chaperonina presente en el citosol de las células eucariotas pertenece al grupo II de chaperonas moleculares y se conoce como CCT (del término inglés “*cytosolic chaperonin containing TCP-1*”) o TriC (del término inglés “*TCP-1 ring complex*”) (Gao y cols, 1994). CCT es una máquina molecular del plegamiento que existe en todos los organismos vivos eucariotas y emplea ciclos de unión e hidrólisis de ATP para generar cambios alostéricos que promueven el plegamiento correcto de la proteína en el hueco existente en el interior de la chaperonina. Tienen un peso molecular de 800-1000 kDa y las subunidades que la componen son de alrededor de 60 kDa.

III.3.4.2 Ruta postchaperonina y dimerización de α - y β -tubulina

Cuando los monómeros de α - y β - tubulina son liberados de su interacción con la CCT ambas subunidades deben de interactuar entre sí para formar el heterodímero e incorporarse al MT (Tian y cols, 1995). Esta unión tiene lugar a través de un proceso complicado denominado “ruta de plegamiento de tubulina post-chaperonina” y precisa de una serie de cofactores proteicos (TBCs, Cofactores de la tubulina, del término inglés “*Tubulin cofactors*”) (Zabala y Cowan, 1992) que actúen de manera coordinada para facilitar la asociación de una α - con una β -tubulina, e incorporarse al MT tras la hidrólisis de GTP (Fontalba y cols, 1993).

Hasta la fecha se han identificado seis proteínas que intervienen en el proceso de formación del heterodímero de tubulina *in vitro* tras su liberación de CCT. Cinco de estas proteínas participan directamente en su formación: cofactor A o p14 (TBCA, del término inglés “*tubulin cofactor A*”), cofactores C (TBCC, del término inglés “*tubulin cofactor C*”), D (TBCD, del término inglés “*tubulin cofactor D*”) y E (TBCE, del término inglés “*tubulin cofactor E*”) y cofactor B (TBCB, Cofactor del término inglés “*tubulin cofactor B*”), (Campo y cols, 1994; Gao y cols, 1994; Tian y cols, 1996; Tian y cols, 1997;). La sexta proteína, Arl2 regula la actividad del cofactor D. Todos ellos están conservados evolutivamente y se ha demostrado, tanto en levaduras como en plantas, que son necesarios para la supervivencia de la célula (Bhamidipati y cols, 2000).

En el caso de la β -tubulina, el monómero casi nativo o desplegado puede interaccionar tanto con TBCA o con TBCD, formando los complejos β /TBCA y β /TBCD y puede transferirse de uno a otro cofactor (Tian y cols, 1996). El monómero de α -tubulina podrá unirse tanto a TBCB como a TBCE para formar los complejos α /TBCB y α /TBCE (Tian y cols, 1997). Tanto TBCA como TBCB podrían actuar como reservorios del exceso de α - y β -tubulina respectivamente, alterando el equilibrio de la reacción y proporcionando una fuente de proteína para la unión a TBCE y TBCD (Tian y cols, 1997).

Una vez formados los complejos entre α -tubulina y TBCD y β -tubulina y TBCE, éstos interaccionan entre sí para formar el complejo β /TBCD/ α /TBCE, que en presencia de iones de magnesio y moléculas de GTP y tras la intervención del cofactor C como estimulador de la actividad GTPasa de β -tubulina, se libera el heterodímero-GDP plegado correctamente, siendo capaz de incorporarse al MT (Fontalba y cols, 1993; Radcliffe y col, 2000; Tian y cols, 2010).

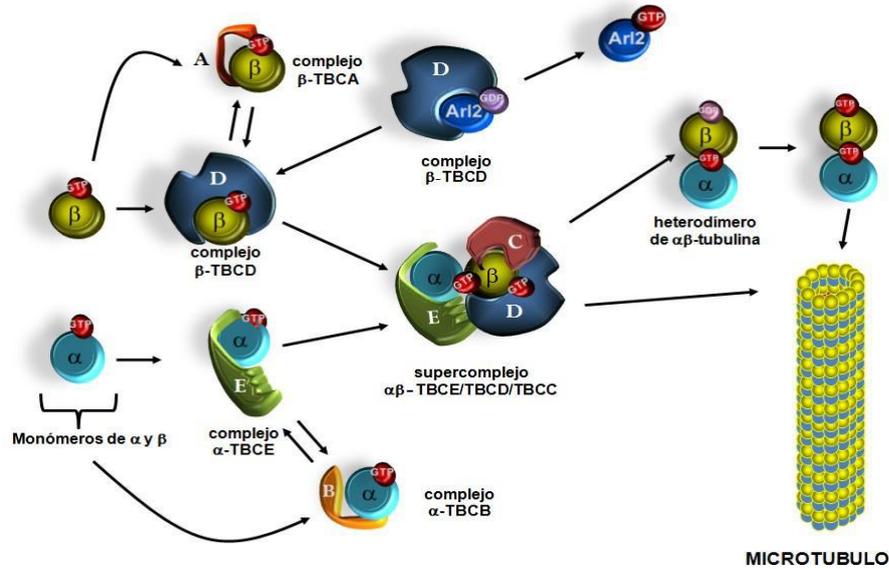


Fig.I-5: Modelo de la dimerización de la tubulina en la ruta postchaperonina (tesis Carranza, 2010).

Al igual que existe la ruta de liberación del heterodímero para su incorporación al MT, también puede ocurrir la ruta inversa, donde los cofactores TBCE y TBCD captan la α - y β -tubulina del heterodímero, respectivamente. El cofactor TBCD tiene la capacidad de disociar el heterodímero de tubulina, secuestrando la β -tubulina (Tian y cols, 1997; Martin y cols, 2000) y, TBCE a la α -tubulina, llegando incluso a la despolimerización de los MTs de la célula en condiciones de sobreexpresión.

Diversos estudios sugieren también que TBCB interacciona con TBCE para facilitar la disociación del heterodímero de tubulina por parte de este último, dando lugar a la formación de un complejo ternario entre TBCB, TBCE y α -tubulina, que se corresponde con una estequiometría 1:1:1 (Kortazar y cols, 2007).

De esta manera, TBCE y TBCB podrían regular los niveles de tubulina libre o dimerizada y dependiendo de las necesidades de la célula, estos monómeros de tubulina podrían ser reutilizados con la ayuda de los demás cofactores para formar el heterodímero o, probablemente, podrían ser llevados a degradación (Fig. 6). Se cree que es el dominio *UBL* (del término inglés “Ubiquitin-like”) que poseen estos cofactores, el lugar por donde podrían interactuar con el proteasoma, vinculando la disociación de la tubulina con su degradación *in vivo*, pero es un proceso todavía no estudiado (Bartolini y cols, 2005; Kortazar y cols, 2007).

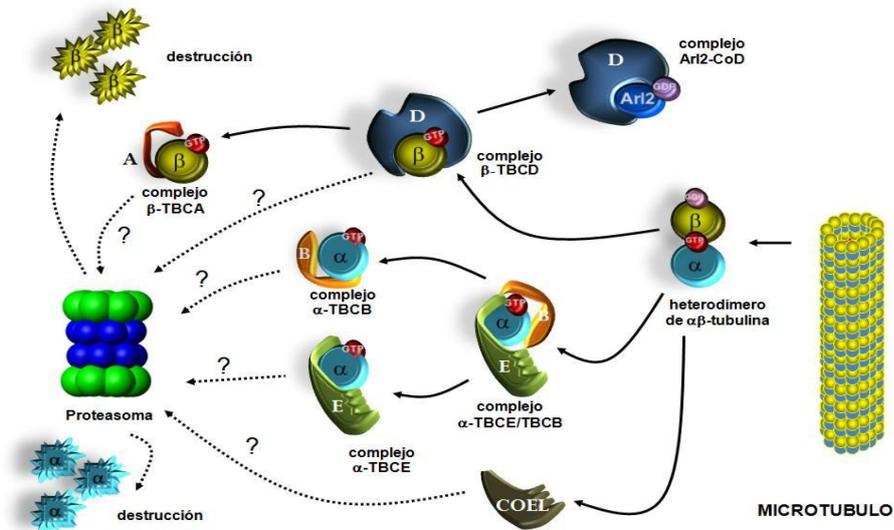


Fig.I-6: Modelo de disociación del dímero de tubulina (tesis Carranza, 2010).

III.4 Los Cofactores del plegamiento de la tubulina:

III.4.1 Cofactor A

El cofactor A, también denominado p14, CoA o TBCA fue el primer cofactor del plegamiento de tubulina descrito. TBCA fue en un principio identificado como cochaperonina de la proteína CCT (Gao y col., 1994), ya que liberaba β -tubulina del complejo formado con CCT, aunque estudios posteriores demostraron que no existía interacción directa entre ellas (Melki y cols, 1996). Simultáneamente TBCA fue purificada de testículos de cerdo y definida como una proteína capaz de liberar/capturar monómeros de β -tubulina del complejo intermedio del plegamiento de tubulina C300 (Campo y cols, 1994).

Se han encontrado homólogos de TBCA en numerosas especies y tanto en vertebrados como en levaduras actúan en la ruta de génesis del heterodímero de tubulina (Llosa y col, 1996) y como reservorio celular del exceso de β -tubulina (Fanarraga y col, 1999b). En levaduras como *S. Cerevisiae*, el ortólogo, Rbl2p (30% de identidad con TBCA), no es esencial para la célula, pero es capaz de rescatarla de letalidad cuando se sobreexpresa β -tubulina (Archer y col., 1995) y su delección causa alteraciones en las estructuras de los MTs. Sin embargo en *S. Pombe*, Alp31 (30% de identidad con TBCA) es requerido para el control de la polaridad del crecimiento y para mantener la integridad de los MTs citoplasmáticos (Radcliffe y Toda, 2000b). El ortólogo en *A.*

thaliana (KIS, 44% de identidad respecto al humano) resulta ser esencial ya que los *knockouts* del gen dan lugar a la muerte de los embriones (Steinborn y cols, 2002). Este fenotipo mutante puede ser rescatado al sobreexpresar α -tubulina, sugiriendo un papel de control por parte de TBCA en la relación de α - y β -tubulina. En ratones, la expresión de TBCA es mayoritaria en testículos y su patrón de expresión coincide con el de β -tubulina durante la espermatogénesis (Fanarraga y cols, 1999b). Experimentos *in vitro*, han demostrado un doble papel por parte de TBCA ya que actúa tanto como reservorio de β -tubulina como aumentando la tasa de dimerización de tubulina.

En humanos, TBCA es esencial para la viabilidad celular ya que estudios realizados con ARN de interferencia para silenciar a TBCA en líneas celulares Hela y MCF7, han mostrado que cuando no existe expresión de TBCA en las células Hela se produce una disminución en la cantidad de tubulina soluble, modificaciones en los MTs, y el arresto celular en G1, mientras que en las células MCF7 tiene lugar un cambio en la forma celular similar al proceso de diferenciación y posterior muerte celular (Nolasco y col, 2005).

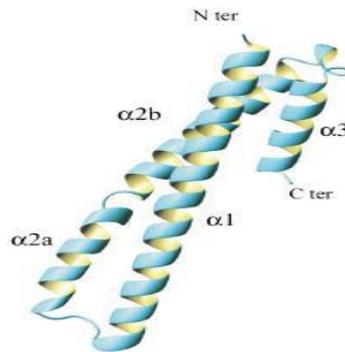


Fig.I-7: Estructura tridimensional de TBCA humano (Guasch y cols, 2002).



Fig.I-8: Estructura del gen de TBCA humano (GENE, NBCI). El gen humano está localizado en el cromosoma 5 (5q14.1), codifica para una proteína de 108 aminoácidos y, hasta el momento, solo se ha identificado una isoforma.

III.4.2 Cofactor B

El cofactor B del plegamiento de la tubulina, también llamado CoB, CKAP1 o TBCB, forma parte de la ruta de plegamiento postchaperonina de α -tubulina (Tian y cols, 1997) y al igual que con el resto de los cofactores se han encontrado homólogos de TBCB en diferentes especies. En *S. cerevisiae* la sobreexpresión de Alf1p (ortólogo de TBCB) no tiene efecto aparente en la viabilidad celular pero la combinación de una mutación de α -tubulina con la mutación nula de Alf1p resulta letal (Tian y cols, 1997). Mutantes del gen de Alf1p sensibles a temperatura muestran mitosis alterada, pérdida de estructuras microtubulares y división celular asimétrica (Hirata y cols, 1998). En *S. pombe*, Alp11 (ortólogo de TBCB) es esencial para la viabilidad de la célula y su sobreexpresión es letal para ésta, ya que produce una despolimerización de MTs (Radcliffe y Toda, 2000b). El ortólogo de TBCB en *A. thaliana* se denomina AtTFCB (Steinborn y cols, 2002) pero, en este caso, no se han encontrado mutaciones para su gen.

TBCB representa a una familia de proteínas de unos 244 aminoácidos con una masa molecular de unos 27 kDa y todos los homólogos de TBCB estudiados hasta el momento poseen tres dominios diferenciados. Un dominio amino-terminal caracterizado como dominio *UBL*, un dominio central *coiled-coil* y un dominio C-terminal CAP-Gly.

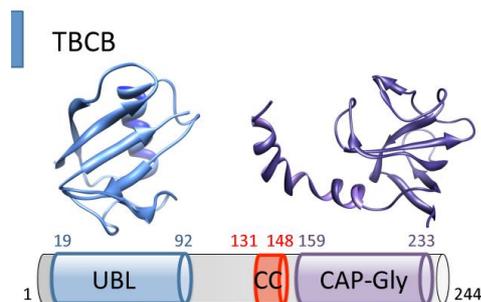


Fig.I-9: Esquema de TBCE donde se muestran los dominios UBL (Zhao y col., 2003) y CAP-Gly (Saito y col, 2004) (en tesis Serna, 2013).

El dominio C-terminal CAP-Gly, ha sido descrito como un dominio de unión al citoesqueleto, concretamente a α -tubulina (Tian y cols, 1997; Feierbach y cols, 1999) y

parece ser que no es esencial para que TBCB realice su función ya que actuaría estabilizando la interacción con α -tubulina (Radcliffe y Toda, 2000b).

TBCB colabora con TBCE en la regulación de la dinámica de los MTs (Bhamidipati y col, 2000; Martín y col, 2000; Kortazar y col, 2006; Kortazar y col, 2007). La interacción entre estas dos proteínas tiene lugar a través de los tres últimos aminoácidos del extremo C-terminal de TBCB (Carranza y col, 2013).

Junto a la zona amino-terminal (N-terminal) del dominio CAP-Gly existe un dominio intermedio independiente, corto y helicoidal, que se describe como una hélice superenrollada (del término inglés “*coiled-coil*”) (Li y cols, 2002b; Grynberg y cols, 2003). Este dominio es necesario para mantener el nivel de α -tubulina y es también la zona donde se unen proteínas reguladoras como Pak1 que fosforila a TBCB (Vadlamudi y cols, 2005).

El dominio N-terminal, denominado dominio *UBL*, es esencial para su actividad y aunque no se conoce su función en profundidad es posible que pueda tener alguna función relacionada con procesos de degradación pese a que, a nivel de secuencia, su similitud con otras proteínas *ubiquitin-like* es muy baja (Bartolini y cols, 2005). También podría servir para interactuar con otras proteínas (Lytle y cols, 2004) ya que en *S. pombe* se ha observado que interactúan por diferentes sitios con α -tubulina y/o TBCE (Radcliffe y cols, 1999). La interacción entre TBCB/TBCE, aunque no está del todo caracterizada, supone un incremento en la capacidad de despolimerizar MTs (Kortazar y cols, 2007).

Diversos trabajos hacen pensar que TBCB es una proteína muy regulada y que podría jugar un papel importante como reguladora de la polimerización de los MTs. TBCB también interactúa con α -tubulina cuando esta se encuentra unida a CCT (Carranza y col, 2013). Ha sido propuesto que una vez finalizado el plegamiento de la α -tubulina, esta es liberada de CCT y unida a TBCB evitando de esta manera que los monómeros de α -tubulina polimericen entre sí. Posteriormente, por un lado TBCB transferirá el monómero de tubulina correctamente plegado a TBCE para que tenga lugar la formación del dímero de α - y β - tubulina y su incorporación al MT en crecimiento. Y por otro lado, en el caso de que el plegamiento de la subunidad de α -

tubulina hubiera sido defectuosos, TBCB transferirá el monómero de tubulina a la ruta de degradación vía proteosoma (Voloshin y col, 2010; Carranza y col, 2013).

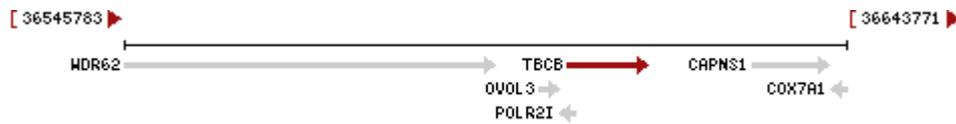


Fig.I-10: Esquema del gen de TBCB (GENE, NBCI). En humanos existe un único gen localizado en el cromosoma 19, en la posición 19q13.11-q13.12, tiene un tamaño de 10,5 Kb y contiene 6 exones.

TBCB está involucrado en el desarrollo neuronal y de los MTs del cono del crecimiento neuronal o de las protrusiones neuronales; en la reorganización del citoesqueleto durante la activación de la microglía; o mediando el transporte de tubulina a través de su interacción con p150 (López-Fanarraga y col., 2007; Bivi y col., 2009; Fanarraga y col., 2009; Kuh y col., 2012; Carranza y col., 2013).

III.4.3 Cofactor C

El cofactor C, también denominado CoC o TBCC, es la proteína encargada de liberar los heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina competentes para incorporarse al MT, a partir del complejo formado por α -tubulina, CoE, β -tubulina y CoD. El cofactor C induce la hidrólisis del GTP unido a β -tubulina por parte de esta última.

Al igual que con el resto de los cofactores, se han encontrado homólogos de TBCC en diferentes especies. El ortólogo de TBCC en *S. cerevisiae* (Cin2p) (Bhamidipati y col., 2000) interviene en el proceso de formación del heterodímero de tubulina, pues se ha demostrado su interacción con Cin4p en experimentos de doble híbrido (Hoyt y cols, 1997). En *A. thaliana*, PORCINO (POR), que es el ortólogo de TBCC es esencial para la viabilidad de la célula y no colocaliza con MTs (Steinborn y cols, 2002) mientras que en *S. Pombe* la existencia de un ortólogo de TBCC está sin confirmar.

TBCC se mueve como una proteína de 40 kDa en electroforesis SDS-PAGE, y está compuesto por un dominio N-terminal que posee una similitud estructural con una repetición de espectrina, y un dominio C-terminal que tiene similitud significativa con

un dominio CAP implicado en la unión a actina, encontrado en otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto (Grynberg y cols, 2003).

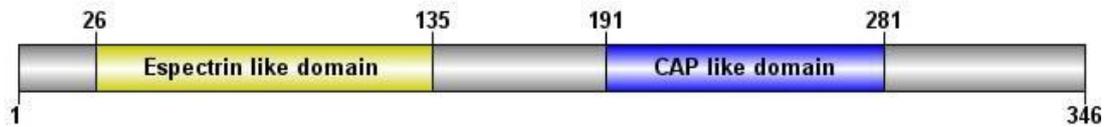


Fig.I-11: Esquema de TBCC en el que se muestran los dominios de la proteína (Tesis Carranza, 2010).



Fig.I-12: Esquema del gen de TBCC (GENE, NCBI). Su único gen en humanos está localizado en el cromosoma 6 (6p12.1) y contiene únicamente un exón.

III.4.4 Cofactor D

El Cofactor D, CoD o TBCD (*Tubulin cofactor D*), interacciona directamente con β -tubulina y forma el complejo TBCD/ β -tubulina (Tian y cols, 1997). De esta manera, forma parte de los complejos intermediarios en el plegamiento de tubulina (Zabala y Cowan, 1992; Fontalba y cols, 1993). Pero además de participar en el proceso de plegamiento de la tubulina, también parece estar implicado, al igual que TBCE, en la regulación de la dinámica microtubular, ya que al sobreexpresarlo en células HeLa y NIH3T3 se despolimerizan completamente los MTs celulares (Martin y cols, 2000). La capacidad de unión de TBCD a β -tubulina se encuentra regulada mediante la proteína Arl2.

Se han identificado homólogos de TBCD en varias especies. En *S. cerevisiae*, la sobreexpresión de Cin1p (ortólogo de TBCD) da lugar a una pérdida funcional de los MTs (Hoyt y cols, 1997). Sin embargo, la sobreexpresión de Alp1 (ortólogo de TBCD) en *S. pombe* resulta letal para la célula (Hirata y cols, 1998). En plantas, el ortólogo en *A. thaliana* se denomina TTN1 (TITAN1) y es esencial para la supervivencia de la célula. TBCD se mueve como una proteína de 130 kDa en geles SDS-PAGE (Tian y

cols, 1996). Análisis de su secuencia revelan la presencia de repeticiones tipo HEAT en la región C-terminal (Radcliffe y col, 1999) y Armadillo en la región N-terminal, estando ambos relacionados con interacciones proteína-proteína (Grynberg y cols, 2003).

Se ha demostrado que TBCD es una proteína centrosómica que esta implicada en el reclutamiento de proteínas a la matriz pericentriolar como la γ -tubulina ya que cuando se sobreexpresa se produce la pérdida del anclaje de los MTs al γ -TURC (Cunningham y Kahn, 2008). Además participa en la organización del huso mitótico, en la centriologénesis, en la ciliogénesis, y en la abscisión de la célula tras la mitosis (Fanarraga y cols, 2010). TBCD se acumula en los polos y se pierde gradualmente durante el proceso de maduración, coincidiendo con la glutamilación de los MTs (Fanarraga y cols, 2010).

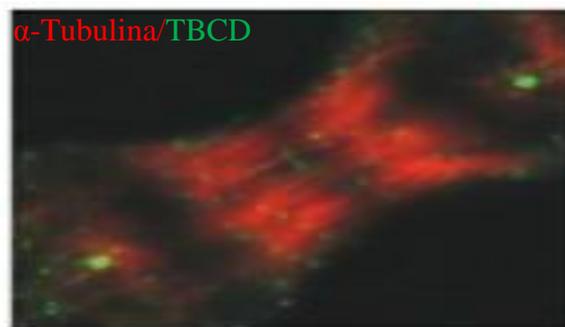


Fig.I-13: Immunolocalización por microscopía confocal de TBCD en los centrosomas en células HeLa en telofase (Fanarraga y cols, 2010).

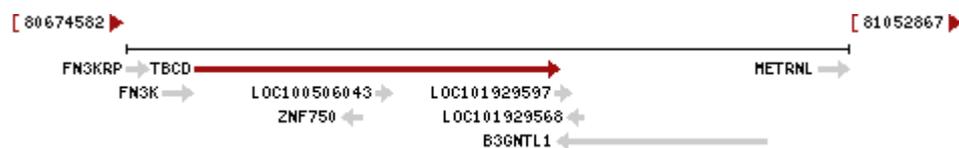


Fig.I-14: Esquema del gen TBCD (GENE, NBCI). El gen humano se localiza en el cromosoma 17 (17q25.3) y aunque bioquímicamente se ha aislado sólo una isoforma, los datos de su secuencia sugieren que pudiera haber más.

III.4.5 Cofactor E

El cofactor E es también denominado CoE o TBCE se une a α -tubulina tras su interacción con CCT, asociándola posteriormente a estos complejos C300 (Tian y cols,

1996) y su sobreexpresión en células HeLa conlleva la completa destrucción de los MTs celulares, al igual que ocurre con TBCD (Bhamidipati y cols, 2000). Se han encontrado homólogos del TBCE en diferentes especies. Pac2p, el ortólogo del TBCE en *S. cerevisiae*, con un 26% de homología con TBCE humano (Hoyt y cols, 1997), es necesario para la estabilidad de los MTs y en condiciones normales no es esencial para la viabilidad de las células, aunque se puede convertir en esencial en condiciones en las que los niveles de tubulina disociada estén aumentados (Fleming y cols, 2000). El ortólogo en *S. pombe*, Alp21 (Radcliffe y cols, 1999), es un gen esencial en dicho organismo y está implicado en la generación normal de MTs. En *A. thaliana*, mutaciones en el gen que codifica para la proteína PFI, ortólogo de TBCE, producen defectos severos en los MTs. En *D. melanogaster* el ortólogo de TBCE, CG7861, es necesario para el normal desarrollo y función de la sinápsis neuromuscular y promueve la formación de MTs *in vivo* (Jin y cols, 2009) y estudios *in vitro* con individuos *knock-out* de TBCE en *D. melanogaster* han demostrado que se trata de un gen esencial. (Jin y cols, 2009).

TBCE representa a una familia de proteínas de unos 527 aminoácidos y una masa molecular aproximada de 60 kDa que esta compuesta por tres dominios, un dominio CAP-Gly, un dominio intermedio y un dominio *UBL*. Los dos dominios terminales son los mismos que los que posee TBCB pero situados de manera inversa, presentando el dominio CAP-Gly en su zona N-terminal (Feierbach y cols, 1999; Radcliffe y cols, 1999) y el dominio *UBL* en su zona C-terminal (Upadhyaya y Hegde, 2003; Bartolini y cols, 2005). Recientemente ha sido resuelta la estructura del dominio de TBCE murino y se ha comprobado que es prácticamente idéntica a la del dominio de TBCB (Sato y cols, 2004). El dominio situado en la zona intermedia de la proteína es un LRR o dominio de repeticiones ricas en leucinas (Kobe y Kajava, 2001).

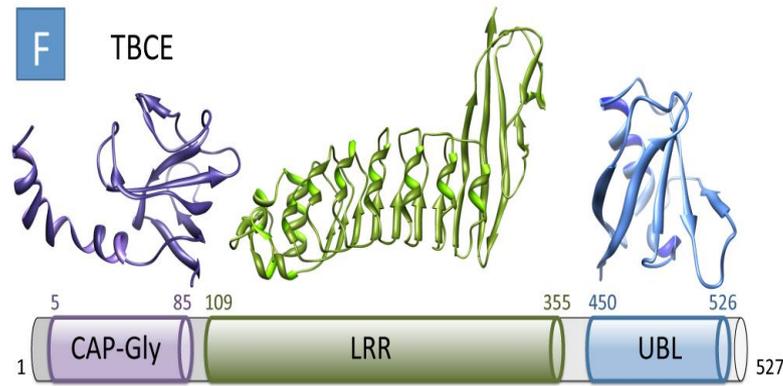


Fig.I-15: Esquema de TBCE en el que se muestran los dominios CAP-gly, LRR y UBL de la proteína (tesis Serna, 2013).



Fig.I-16: Esquema del gen de TBCB (GENE, NBCI). En humanos, el único gen de TBCE está localizado en el cromosoma 1 (1q42.3) y contiene 17 exones, pudiendo dar lugar a dos isoformas diferentes.

En ratones, alteraciones en la actividad de TBCE están relacionadas con neuropatías progresivas motoras (Bommel y col., 2002, Martín y col., 2002) y en humanos con enfermedades autosómicas recesivas como los síndromes de Kenny-Caffey y Sanjad-Sakati (Sanjad y col., 1998; Parvari y col., 2002; Tian y col., 2006).

El síndrome de Sanjad-Sakati *HRD* (*Hipoparatiroidismo, Retraso mental y Dismorfía facial*) es causado por la delección de cuatro aminoácidos en el dominio CAP-Gly de TBCE y sus manifestaciones clínicas son aplasia de paratiroides, retraso en el crecimiento, malformaciones oculares, retraso mental y/o microcefalia (Khan y cols., 2007). Como características secundarias también pueden presentar dismorfía facial, osteosclerosis variable, criptorquidia/microfalosomía y susceptibilidad a la infección bacteriana.

III.4.6 ARL2

Arl2 no es un cofactor del plegamiento de tubulina propiamente dicho pero está directamente implicado en el proceso de dimerización de tubulina y al igual que con

TBCA, se han encontrado homólogos de ARL2 en numerosas especies. El ortólogo de Arl2 en *S. cerevisiae* se denomina Cin4p y el de *S. pombe*, Alp41. En *A. thaliana* se llama HAL o TTN5 y mutaciones en el, producen alteraciones graves en los MTs (Steinborn y cols, 2002) y podría estar implicado en tráfico vesicular (McElver y cols, 2000).

Arl2 es una proteína Arl (del término inglés “*ARF-like protein*”) de 20 kDa, que pertenece a la familia de ARFs (del término inglés “*ADP Ribosylation Factors*”) (Kahn y cols, 2005), y aunque se desconoce su función exacta en lo correspondiente a señalización celular, la coexpresión de TBCD con Arl2 o con mutantes de Arl2 que no se unen a GTP, lleva a la formación de un complejo que puede ser aislado tanto *in vivo* como *in vitro*, capaz de preservar a los MTs de la despolimerización que realiza el cofactor D (Bhamidipati y cols, 2000). Por lo tanto, Arl2 en el proceso de dimerización de tubulina actuaría bloqueando la unión de TBCD con β -tubulina mediante su interacción con TBCD. Por otra parte, solo cuando está unido a GDP (y no a GTP) es capaz de asociarse y secuestrar el cofactor D, inhibiendo de esta manera el paso necesario para la formación del heterodímero de tubulina (Fontalba y cols, 1993).



Fig.I-17: Esquema de ARL2 en el que se muestran los dominios de la proteína (Tesis Carranza, 2010).

La proteína ARL2 se expresa abundantemente en el sistema nervioso central y en el testículo de ratón. En el testículo se localiza preferentemente en el centrosoma de las espermátidas alargadas mientras que en el sistema nervioso central predomina en los cuerpos basales y cilios de las células ependimarias. Además, ARL2 es una proteína cuyos niveles de expresión permanecen relativamente constantes durante la espermiogénesis y el desarrollo del sistema nervioso central (ver Tesis Doctoral de Javier Bellido, 2006).

En humanos, ARL2 es una proteína de 184 aminoácidos de la que, hasta el momento, sólo se ha descrito una isoforma y que unida a GTP adopta la típica estructura de otras proteínas de la familia con una única estructura α -hélice en su extremo N-terminal (Zhang y cols, 2009). El gen humano que codifica para ARL2 se localiza en el cromosoma 11 (11q13).

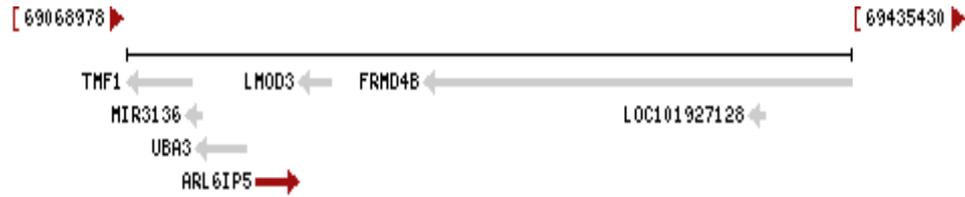


Fig.I-18: Esquema del gen de TBCC (GENE, NBCI).

En resumen, los TBCs poseen una gran importancia ya que las diferentes funciones de los MTs dependen entre otras de estas proteínas. Es decir, la capacidad que tienen en un momento dado de ensamblar o despolimerizar estructuras dinámicas como el huso mitótico o meiótico, ó de formar estructuras rígidas como las que constituyen el citoesqueleto de los axones, cilios o flagelos puede llegar a ser crucial en muchos procesos celulares. Por este motivo, alteraciones en los TBCs podrían estar implicadas directa o indirectamente en patologías muy variadas, tales como procesos neurodegenerativos, alteraciones de la fertilidad, etc.

III.5 LOS MTs EN LA MITOSIS Y LA MEIOSIS:

Durante las divisiones celulares (mitosis y meiosis), los MTs van a jugar un papel fundamental en estos procesos a través de los MTOC que van a dirigirlos y los husos meióticos y mitóticos que van a permitir la segregación correcta del material genético. Dentro de los MTOC se encuentran los centrosomas, los cuales están formados por el material pericentriolar constituido por un gran número de proteínas centrosomales y un par de centriolos dispuestos de forma perpendicular (Schatten y Sun, 2009). Están involucrados en la nucleación de los MTs quedando el extremo – del MT unido a la estructura del centrosoma (Bornens, 2002) y es en el extremo + del MT donde se van a ir uniendo las subunidades de α y β tubulina para que tenga lugar la polimerización del MT. La capacidad de organizar los MTs va a depender de las proteínas asociadas al centrosoma. Mientras α - y β -tubulina son los constituyentes de los MTs, otro tipo de tubulina, la γ -tubulina, forma parte del complejo anular γ TuRC y esta formado por una estructura circular de diámetro similar al de los MTs, contiene entre 10 y 13 moléculas de γ -tubulina, y sirve de punto de inicio de la nucleación de los MTs (Zheng y cols, 1995; Oakley y Oakley, 1989; Oakley y cols, 1990 Moritz y Agard, 2001). El hecho de ser un MTOC, no solo les permite participar en la división celular, si

no que también están implicados en el transporte de señales, vesículas y orgánulos a través de las proteínas motoras asociadas a los MTs etc (Schatten y Sun, 2009).

A partir de dos centrosomas se va a formar el huso mitótico. En la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular va a tener lugar la replicación semiconservativa de los centriolos diferenciándose el madre del hijo por la presencia de apéndices dístales y subdístales (Schatten y Sun, 2009). Durante la fase G2, los centriolos hijos se alargan adquiriendo la longitud adecuada y al inicio de la fase de mitosis, se produce un incremento del material pericentriolar (PCM, material pericentrosomal, del término inglés "*pericentriolar material*") y en el número de MTs que separan los dos centrosomas formando el huso mitótico (Palazzo y col, 2000; Blagden y Glover, 2003; Chatzimeletiou, 2008).

El huso mitótico está constituido principalmente por MTs y proteínas asociadas. Su función es alinear los cromosomas replicados en un plano que secciona a la célula en dos y posteriormente desplazar los cromosomas hijos a los polos opuestos del huso (Albert y col, 1993). Durante la Profase, los cromosomas se condensan y los centrosomas hijos en fase de separación, van a actuar como MTOC de MTs (Mayor y col, 1999) dirigiendo la nucleación de una formación de MTs radiales, llamada aster (Albert y col, 1993). Al ir avanzando el proceso, los dos centrosomas se separan siguiendo caminos opuestos a lo largo de la parte exterior del núcleo y los MTs, que conectan los dos ásteres, se alargan formando el huso mitótico. Al final de la Profase, la membrana nuclear desaparece y los cromosomas interaccionan con el huso mitótico a través de los cinetocoros quedando alineados formando la placa metafásica durante la Metafase. En la Anafase, se va a producir la segregación de las cromátidas hermanas hacia los polos opuestos de huso mientras sus MTs van a continuar alargándose durante las siguientes fases, incrementado de esta manera la separación entre los polos celulares. Una vez que se ha producido la separación del material genético, se vuelve a formar la envuelta nuclear dejando a los centrosomas fuera.

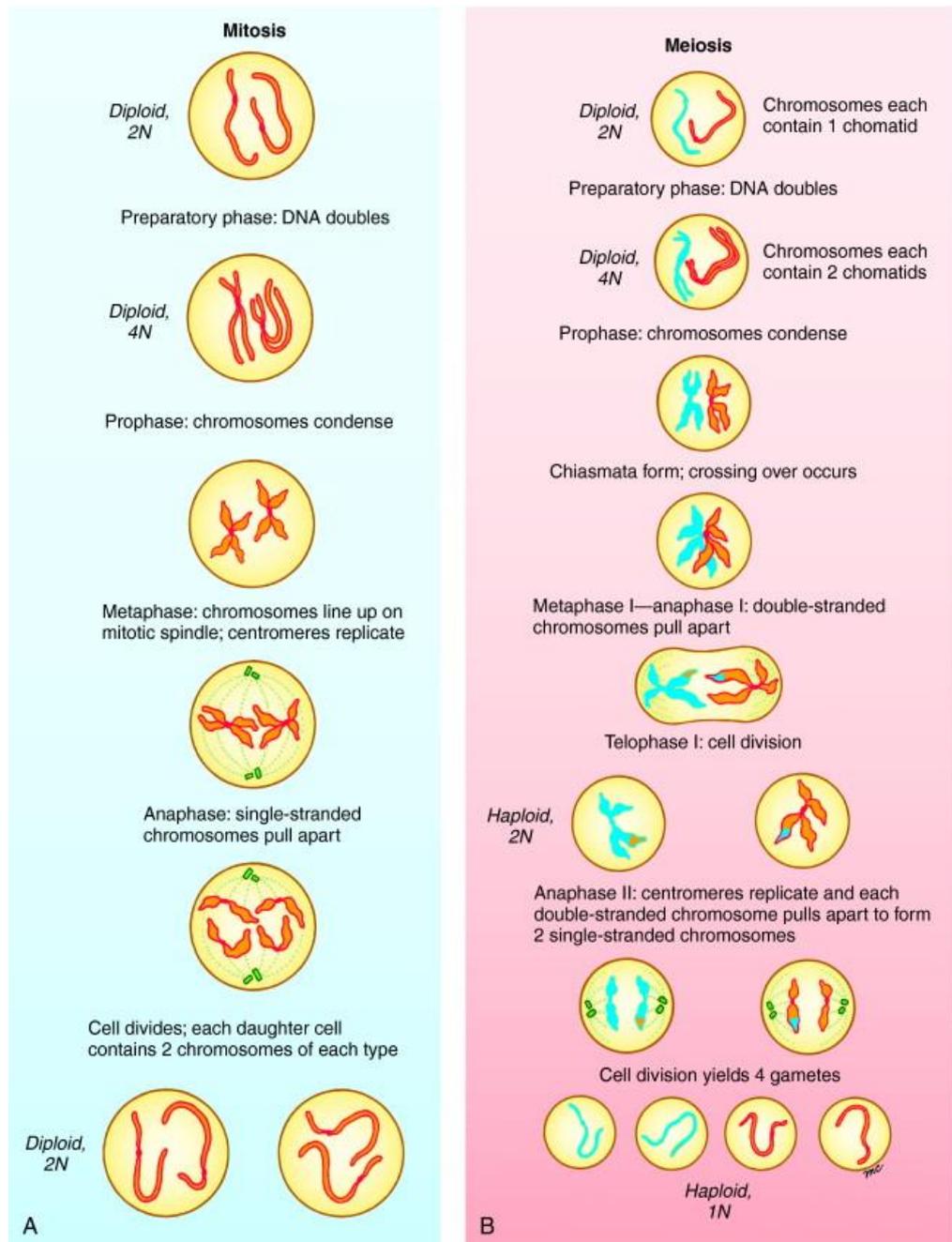


Fig.1-19: Esquema comparativo de Meiosis y Mitosis (Schoenwolf, Gary C., Ph.D., Larsen's Human Embryology)..

La división celular por meiosis, tiene lugar en los ovarios y en los testículos y comprende dos divisiones nucleares y citoplasmáticas, meiosis I y meiosis II, que van a dar como resultado la formación de células haploides. Cada una de estas divisiones, consta de una profase, metafase, anafase y telofase. A su vez la etapa de Profase I (PI) se divide en varias fases. Durante la fase de preleptoteno, tiene lugar la duplicación del

ADN y el posterior desarrollo de las cromátidas hermanas dando lugar a células tetraploides o diploides $4n$ (Matsumoto y col., 1996). Seguidamente, en las fases de leptoteno y cigoteno, los cromosomas se condensan y se inicia el proceso de recombinación genética apareciendo la formación de complejos sinaptonémicos entre los dos grupos de cromátidas hermanas de cada cromosoma bivalente (Alberts y col, 1993). En la fase de paquiteno, de duración larga tiene lugar la síntesis elevada de ARN, produciéndose el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos (del término inglés “*crossing over*”) (Gil y col, 2002). En la fase de diploteno, se deshacen los complejos sinaptonémicos y la cromatina se condensa.

Al final de la PI, se inicia la formación del huso meiótico a partir de los MTs, que forman parte de los asteres que emergen de los centrosomas que se están desplazando en direcciones opuestas a lo largo de la parte exterior del núcleo. Al terminar la PI, se inicia la Metafase I (MI) en la que se produce la desestructuración de la membrana nuclear, se termina de formar el huso meiótico y los cromosomas bivalentes interaccionan con los MTs del huso a través de los cinetocoros, formando la placa metafásica. La presencia de quiasmas entre cromosomas homólogos mantiene la tensión entre ellos y por lo tanto ayuda a la correcta orientación de los bivalentes en la placa metafásica (Blanco y col, 2012).

Durante la Anafase I, los cromosomas homólogos se separan y segregan hacia los polos opuestos de la célula, de tal manera que la mitad del número original de cada cromosoma (cada uno compuesto por dos cromátidas) emigra hacia cada polo celular (Gil y col 2012). En la telofase, los MTs del huso van a continuar alargándose incrementando la separación entre los dos polos celulares y los cromosomas llegan a los lados opuestos de la célula, se desenrollan ligeramente y comienza a formarse una nueva envuelta nuclear (Gil y col, 2012). La segunda división meiótica es muy similar a la primera pero en ella no va a tener lugar la replicación del ADN.

Tanto en la mitosis como en la meiosis, los MT van a formar parte del punto de control que regula el paso de MI a Anafase I, denominado Punto de Control de formación del Huso (SAC, del término inglés *Spindle Assembly Checkpoint*). Este mecanismo detiene a las células en el estadio de MI cuando detecta anomalías en las fuerzas de tensión que ejercen los MTs en los cromosomas, o cuando estos últimos no están correctamente alineados en la placa metafásica (Vogt y col 2008).

III.6 Los MTs en gametos humanos:

Para que tenga lugar el nacimiento de un individuo sano, es necesaria la formación de un embrión sano y esto requiere de una serie de pasos entrelazados entre sí tales como la formación y maduración de los gametos, fecundación, fusión de los genomas masculinos y femeninos, divisiones celulares, implantación etc.

Uno de los puntos críticos, es la formación y maduración de los gametos ya que van a definir la calidad de los mismos y estos a su vez van a ser vitales para la preservación de la especie humana porque van a determinar en gran medida las características intrínsecas de los embriones que se generen a partir de ellos, tales como la calidad de su citoplasma y su constitución cromosómica (Huisman y col, 2000) así como su capacidad de implantar en el útero materno. Los MTs intervienen en la formación de ovocitos humanos (ovogénesis) y espermatozoides (espermatogénesis), tanto en la maduración del núcleo como del citoplasma participando en procesos fundamentales de la biología celular que incluyen: la separación de las cromátidas en la mitosis/meiosis, la citocinesis, el transporte intracitoplásmico, la formación del "*manchette*", el ensamblaje y mantenimiento de flagelos, así como el mantenimiento de la citoarquitectura en general. En todos los procesos donde interviene los MTs van a estar implicados los TBCs para su mantenimiento y dinámica.

III.6.1 Espermatozoides:

Los espermatozoides maduros son células muy especializadas y móviles cuyo origen tiene lugar durante la espermatogénesis que consiste en una serie de transformaciones que requieren cambios dramáticos en la organización de los MTs (Sperry, 2012), mediante las cuales las espermatogonias evolucionan hasta convertirse en espermatozoides (Ballescá, 2003). En este proceso las células madre o espermatogonias (diploides), no solo van a mantener la reserva de células *stem* mediante divisiones mitóticas, sino que también se van a diferenciar en espermatocitos que van a entrar en meiosis dando lugar a células haploides, espermátidas (Hunter y col 2012). Estas células, van a sufrir grandes cambios tanto bioquímicos como morfológicos transformándose en espermatozoides maduros que se separarán de las células de Sertoli para posteriormente migrar por el epidídimo y completar su maduración (Hunter y col 2012).

La espermatogénesis tiene lugar durante la pubertad, aproximadamente a los trece años y sé continua, en mayor o menor intensidad, durante el resto de la vida del varón (Ballezcá, 2003, Guyton y col 1996). En la especie humana, la espermatogénesis dura entre 65 y 75 días y va a estar regulada por un complejo sistema de actividades paracrinas y endocrinas que van a tener lugar en el tejido testicular (Hunter y col 2012).

Se trata de un proceso complejo donde se va a producir por un lado la división del núcleo celular (mitosis y/o meiosis) con la segregación de los cromosomas y la formación de dos núcleos y por otro lado la división incompleta del citoplasma (citocinesis) que da lugar a la formación de un sincitio. Esta formación conecta a través de puentes citoplasmáticos los clones de células hijas diferenciadas (haploides) descendientes de una espermatogonia madura y permite que sean abastecidas con todos los productos de un genoma diploide completo que va a dirigir su diferenciación (Albert y col, 1993). A lo largo de estos eventos, van a participar tres estructuras citoesqueléticas de gran importancia, los centrosomas, el huso mitótico y el anillo contráctil de filamentos de actina y de miosina II (Albert y col, 1993).

III.6.1.1 Etapas de la espermatogénesis.

En la espermatogénesis se distinguen tres fases (Junqueira y col, 1995, Gil Salom y col, 2002) donde los MT van a jugar un papel importante:

Fase proliferativa o espermatogónica: mediante mitosis se produce la repoblación de células madres o espermatogonias que finalmente se diferenciarán en espermátocitos (Gil Salom y col, 2002). En base a las características de sus núcleos y en el modo en que se tiñe su cromatina, las espermatogonias se dividen en 3 tipos (Monesis, 1962; Schlatt y col, 1994; Phillips y col, 2010). Las espermatogonias oscuras (Ad) son consideradas las células madre de la espermatogénesis (Schlatt y col, 1994) y en condiciones normales, presentan un índice de división mitótica bajo que les confiere una cierta resistencia a las agresiones producidas por agentes externos tales como la radioterapia, quimioterapia etc.(Meistrich y col, 1993).

Durante esta fase, las Ad, se dividen por mitosis dando lugar a espermatogonias pálidas (Ap), las cuales también sufren procesos de mitosis para aumentar su número, manteniéndose unidas todas las células que se derivan del mismo par de espermatogonias Ap. El resultado de la última división mitótica de estas células da lugar

a las espermatogonias B que son las células progenitoras de los espermatocitos primarios (Junqueira y col 1992).

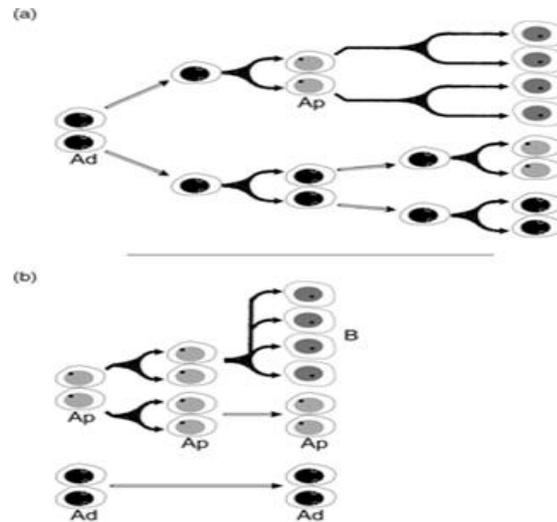


Fig.I-20: Dos esquemas diferentes sobre la proliferación de las espermatogonias. A: propuestos por Clermont y col (1966) donde las espermatogonias Ap no se renuevan así mismas. B: propuesto por Ehmcke y col (2006) donde las espermatogonias Ap renuevan su población mediante mitosis.

Fase de meiosis o espermatocítica: los espermatocitos sufren dos divisiones celulares completas con una sola replicación del ADN. (Gil Salom y col, 2002) dando lugar a células haploides (espermátidas) con la mitad de cromosomas y ADN que las células diploides. Son los espermatocitos primarios los que van a sufrir la primera división meiótica o reduccional dando lugar a la formación de dos espermatocitos secundarios con un número haploide de cromosomas pero con un contenido en ADN todavía diploide (Gil Salomon y col 2002). Los espermatocitos secundarios son células más pequeñas con una vida media muy corta. Después de un breve periodo en Interfase entran rápidamente en la segunda división meiótica, dando lugar a la formación de dos espermátidas con dotación tanto cromosómica ($23 n$) como en ADN haploide, ya que entre la primera y segunda división meiótica no va a tener lugar la replicación del ADN.

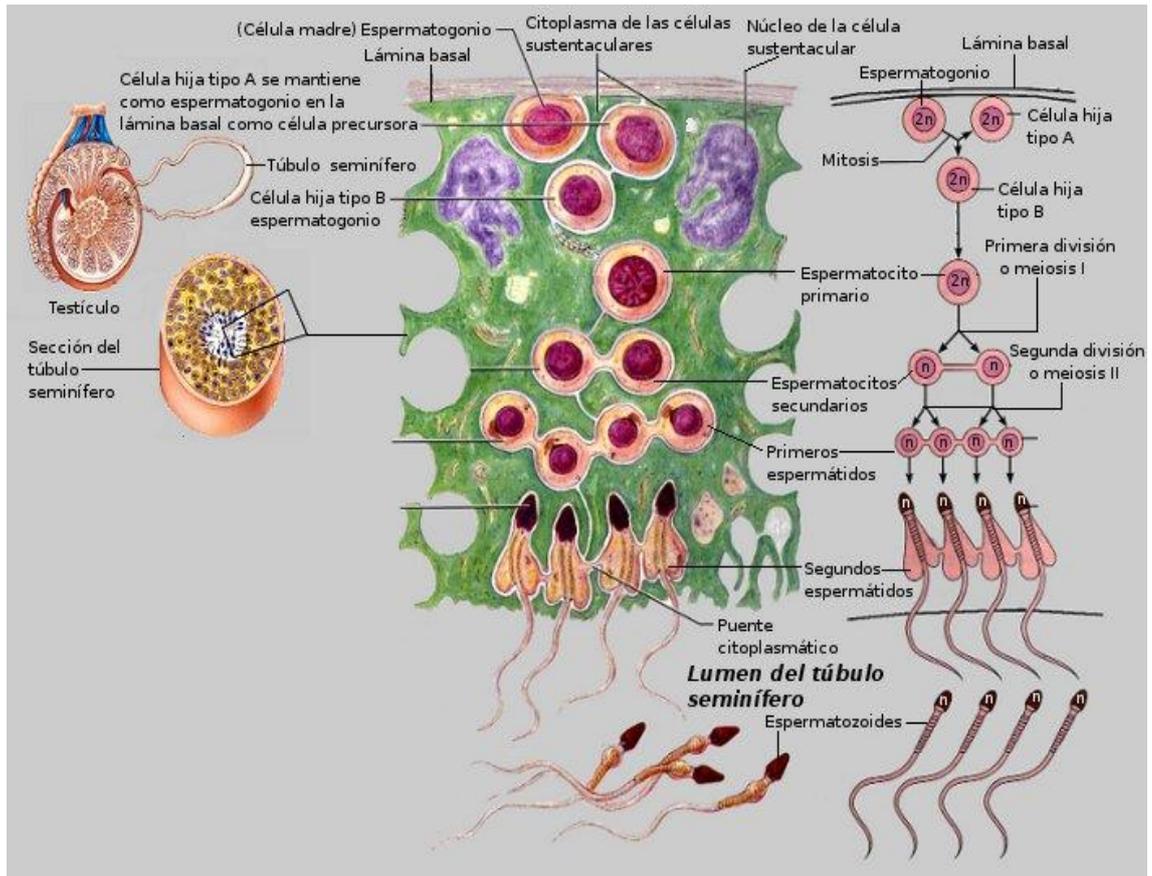


Fig. I-21: Esquema general de la espermatogénesis donde se observan las diferentes etapas: fase proliferativa, fase de meiosis y espermiogénesis (<http://www.sabelotodo.org/fisiologia/fisiologiamasculino.html>)

La segunda división meiótica es muy similar a la mitosis, con la salvedad de que el núcleo celular contiene un número haploide de cromosomas. Durante la Profase II los cromosomas se ensanchan (Gil Salom y col, 2002), la envoltura nuclear desaparece y empieza a formarse el huso meiótico entre los centrosomas en separación (Alberts y col 1993). Durante la Metafase II (MII), los 23 cromosomas se alinean ayudados por los MTs cinetocóricos en un plano situado a medio camino de los extremos del huso (Alberts y col 1993) formando la placa metafásica. Seguidamente, en la Anafase II se va a producir la migración de cada cromátida homóloga hacia los polos celulares. Posteriormente durante la Telofase II, las cromátidas se agrupan en ambos polos alrededor de los cuales va a empezar a formarse una nueva membrana nuclear y la cromatina condensada se expande de nuevo (Alberts y col 1993). La Telofase va ir acompañada de una citocinesis incompleta que va a dar lugar a la formación de dos espermátidas.

La duración del proceso de meiosis va a estar definida por la duración de la PI (1-3 semanas) y la duración del resto de las fases de la primera división y de la segunda división que se lleva a cabo en 1-2 días.

Espermiogénesis: es el proceso de diferenciación celular que sufren las espermatidas para dar lugar a los espermatozoides maduros sin que se produzca ningún tipo de división celular. Esta fracciónada en las fases de Golgi, Capuchón, Acrosoma y Maduración. Durante estas fases van a tener lugar una serie de cambios funcionales y morfológicos donde el citoesqueleto y en concreto los MTs van a participar, tales como la formación del flagelo y acrosoma, condensación y elongación del núcleo y pérdida de parte del citoplasma (Junqueira y col 1992; Sperry, 2013).

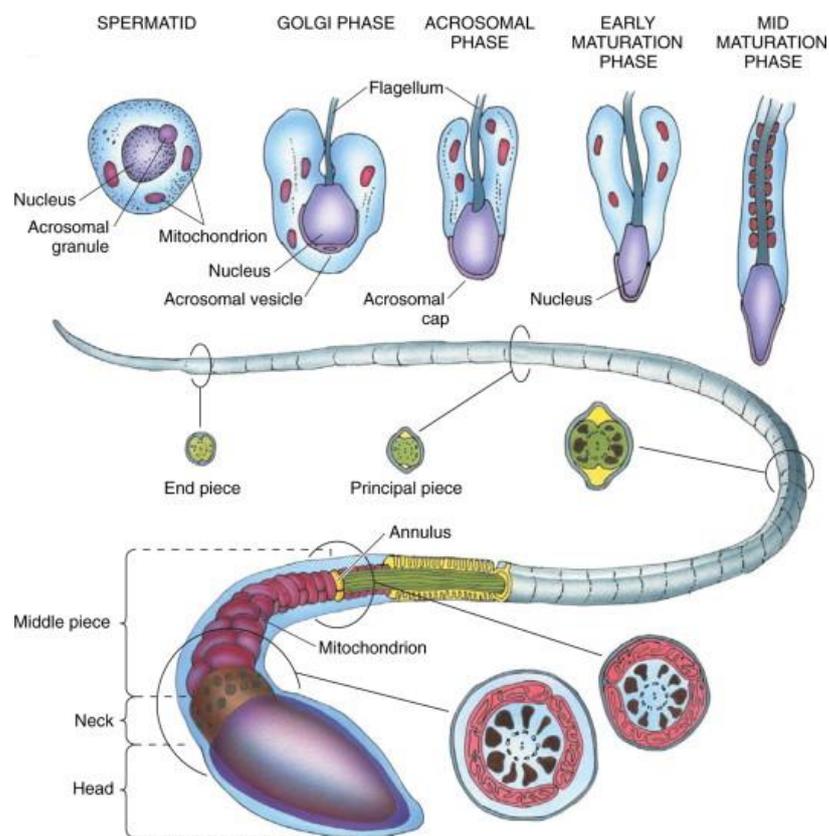


Fig.I-22: Esquema representativo del proceso de espermiogénesis donde se pueden observar los cambios celulares que sufren las espermatidas al transformarse en espermatozoides con la aparición del acrosoma, flagelo, cambios en el núcleo etc. (Garnet, 2007, *Textbook of Histology*, Copyright © 2007).

A. . Formación del acrosoma

La formación del **acrosoma** comprende múltiples pasos y aunque se desconoce el mecanismo exacto, se sabe que incluye procesos de migración de orgánulos así como el desplazamiento de vesículas desde el aparato de Golgi (AG) próximo al núcleo celular y la membrana plasmática (maquinaria endocítica) (Moreno y col 2006; Berruti y col 2011). En el proceso de formación del acrosoma, el citoesqueleto va a participar por un lado en el transporte de los gránulos acrosómicos al lugar de formación del acrosoma mediante dos tipos de transporte, una ruta mediante F-actina y miosina V y otra ruta mediante MTs y kinesinas (Cherry y col 1984, Moreno y col 2000). Y por otro lado, va a formar parte del acroplaxoma, estructura del citoesqueleto, en forma de placa que contiene filamentos de actina, Sack 57 (homólogo de la keratina 5), y proteínas motoras (Kierszenbaum y col, 2003, Kierszenbaum y col, 2004, Kierszenbaum y col 2011).

El acroplaxoma interviene en el proceso de amarre y fusión de las primeras vesículas proacrosómicas al núcleo celular y participa en el proceso de elongación del núcleo modulando las fuerzas tanto extrínsecas como intrínsecas que intervienen en este proceso (Kierszenbaum y col 2003). Además, permite la aproximación de proteínas a la región nuclear cuando la condensación del núcleo y el silenciamiento transcripcional se inician y proporciona un lugar de almacenamiento transitorio para algunas de las proteínas que van a ser transportadas a lo largo del *manchette* (estructura transitoria de MTs) (Kierszenbaum y col, 2011).

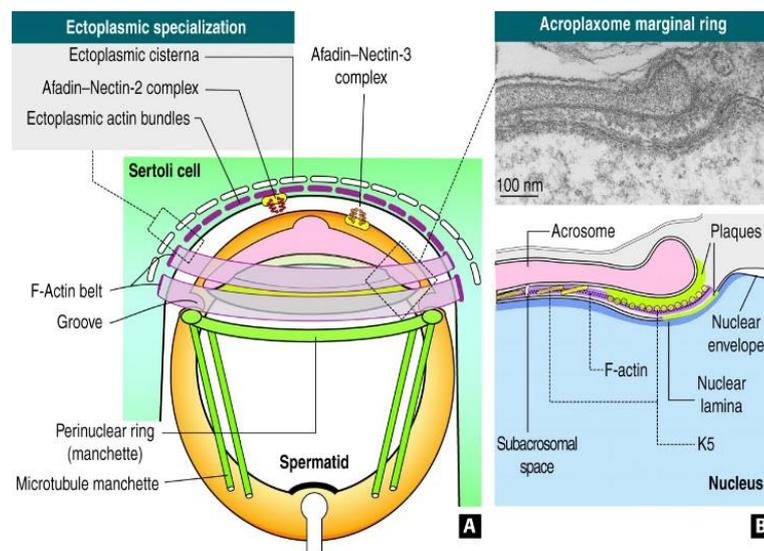


Fig.I-23: Esquema del acroplaxoma y su anillo marginal (Kierszenbaum y col 2003).

B. Maduración y elongación del núcleo

Cuando se inicia el mecanismo de elongación del núcleo, se forma en el citoplasma de las espermatidas una estructura transitoria compuesta por un anillo denso perinuclear localizado, en la zona caudal y próxima al anillo marginal del acroplaxoma, al que se insertan MTs y que recibe el nombre de *manchette*. Los MTs que forman esta estructura, presentan modificaciones post-transduccionales tales como glutamilaciones y tirosinaciones y una única isoforma de δ -tubulina localizada en el anillo perinuclear del *manchette* y en las uniones intracelulares que conectan los espermatoцитos con la cohorte de espermatidas (Smrzka y col, 2000; Kato y col, 2004).

En la frontera entre el anillo perinuclear del *manchette* y el anillo marginal del acroplaxoma, se encuentra una hendidura circunferencial específica que delimita el punto donde termina la interacción entre los aros de F-actina de las células de Sertoli y la cabeza de la espermatida a la que esta unida (Kierszenbaum y col 2011). De esta forma, la cabeza de la espermatida que se esta elongando queda dividida por dos estructuras diferentes del citoesqueleto (acroplaxoma y *manchette*) en dos dominios uno que comprende el complejo acrosoma-acroplaxma que esta fuertemente amarrado a la célula de Sertoli a través de F-actina y un segundo dominio que comprende la parte inferior de la cabeza y esta abrazada por los MTs que forman el *manchette* (Kierszenbaum y col 2011).

La formación del *manchette* se inicia en las espermatidas tempranas y desaparece cuando se han formado los espermatozoides maduros (Sperry, 2012) y aunque su función concreta se desconoce, se cree que ya que su aparición tiene lugar durante la elongación y compactación del núcleo, podría estar involucrado en estos procesos. El anillo marginal del acroplaxoma y el anillo perinuclear del *manchette* se comportan de la misma manera en el límite entre ambos. Es en esta zona donde gradualmente reducen su diámetro de forma simultánea al estrechamiento que sufre el núcleo de la espermatida que se esta elongando y por este motivo se atribuye como función de ambas estructuras su participación en la formación de la cabeza del espermatozoide.

Otra de las posibles funciones que se le atribuyen al *manchette* es su participación en la redistribución del contenido citoplasmático para que posteriormente este pueda ser eliminado de la espermatida madura justo antes del proceso de

espermiación (Sperry, 2012). También participa en el transporte de moléculas o vesículas desde el aparato de Golgi y acroplaxoma al centrosoma y al flagelo en formación y entre el núcleo y el citoplasma de la espermátida (Kierszenbaum y col, 2003; Hayasaka). Algunas de estas moléculas son por ejemplo elementos del proteosoma (Rivkin y col, 1997; Rivkin y col, 2009; Bao y col, 2010), Ran GTPasa (Kierszenbaum y col, 2002; Bao y col, 2011) y Sak 57, Spag4 y ODF1 (Shao y col, 1999; Tres y Kierszenbaum, 1996). Este transporte recibe el nombre de “transporte intramanchette” (IMT, del término inglés “*intramanchette transport*”) y en el participan MTs y proteínas motoras tales como kinesinas y dineínas

C. Formación del flagelo

Durante la fase de Golgi, los centriolos de las espermátidas migran en sentido opuesto a la región donde se está formando el acrosoma, de tal manera que el proximal se une al núcleo en la fosa de implantación nuclear y permanece intacto (Manandhar y col, 2000). El distal se orienta perpendicular a la membrana plasmática sufriendo una degeneración parcial con la pérdida de un 50% de los tripletes de MTs al final del proceso de maduración y se transforma en el sitio de unión del flagelo al cuerpo celular (Manandhar y col, 2000).

Los tripletes microtubulares del distal actúan de plantilla para la formación del axonema del flagelo que, envuelto en la membrana celular, aparece constituido por nueve dobletes periféricos de MTs que se disponen de forma radial alrededor de una pareja de MTs centrales (Fisch y col 2011). Este proceso requiere de un aporte muy elevado de subunidades concretas de tubulina, específicos de testículo, tubulina $\alpha_{3/7}$, y tubulina β_3 (Jiménez-Moreno y col 2010). Y Las tubulinas de los MTs que forman el axonema del flagelo van a presentar modificaciones post-transduccionales tales como glicosilación, glutamilación y tirosinación que están asociadas con la formación de MTs más estables. La síntesis y ensamblaje de las moléculas de tubulina es un proceso complejo que necesita de la presencia de los cinco cofactores de la tubulina (TBCs A-E) y ARL2. De hecho estas proteínas se expresan de forma abundante durante la espermatogénesis (Fanarragan y col, 1999b).

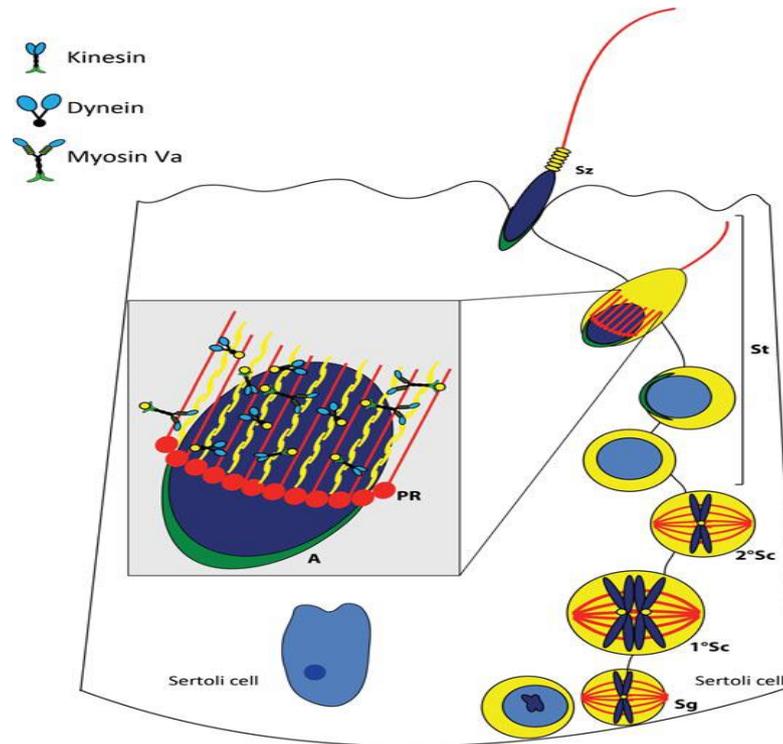


Fig.I-24: Esquema de los cambios que experimenta el citoesqueleto durante la espermatogénesis (Sperry, 2012).

En la fase de acrosoma, los centriolos completan su migración a la parte posterior del núcleo al que se unen a través de una estructura denominada cuello o pieza de conexión, que esta formada por fibras que rodean la membrana del flagelo desde el cuerpo basal hasta el sitio de unión entre el flagelo y la membrana plasmática. (Andres, 1969; Gilula y col, 1972). La pieza de conexión se une en la pieza intermedia del flagelo a nueve pares de fibras densas externas (una por cada doblete de MTs) que rodean y corren paralelas al axonema. Las mitocondrias migran hacia la pieza intermedia y se disponen helicoidalmente en la periferia de las fibras gruesas externas rodeándolas por su lado externo. A continuación de la pieza intermedia, se va a originar una vaina fibrosa que va a rodear al axonema y a las fibras densas gruesas. La membrana plasmática va a ir revistiendo el flagelo a medida que este va creciendo.

En la formación del flagelo, va a jugar un papel esencial el transporte intraflagelar (IFT, del término inglés “*intraflagellar transport*”) que permite el desplazamiento de los componentes del flagelo desde la región pericentrosomal a la cola de la espermátida y viceversa. Esto implica que el centrosoma podría estar actuando como punto de reunión, modificación y ensamblaje de las proteínas que forman el flagelo (Marshall 2007, Kierszenbaum, 2011, Burghoorn y col, 2007). Se trata de un

transporte bidireccional mediado por MTs y proteínas motoras como por ejemplo Kinesina-II que transporta su carga hacia la punta del axonema y dineína 1B que lo hace desde la punta del axonema hasta el citoplasma (Kierszenbaum, 2002). Es muy probable que el IFT tenga lugar en el espacio que hay entre el complejo que forman el axonema, las fibras densas gruesas y la vaina fibrosa (Kierszenbaum, 2002).

III.6.2 Espermatozoide maduro

Como resultado final de la espermatogénesis se va a obtener un espermatozoide maduro. Se trata de una célula muy especializada y móvil que tiene una longitud de aproximadamente 50 a 60 μm y está formado por la cabeza, pieza intermedia y la cola.

III.6.2.1 La cabeza del espermatozoide

La cabeza tiene forma ovoide cuando es observada de frente y piriforme cuando es vista de perfil. Sus dimensiones son 5 μm de longitud por 3 μm de anchura y 1 μm de grosor. Está, a su vez dividida en dos regiones, por un lado la región acrosómica que comprende el acrosoma y la membrana plasmática que lo recubre y el núcleo (Buffone y col, 2013).

El núcleo contiene la versión haploide del material genético masculino (23 pares de cromosomas). La zona de la membrana nuclear en contacto con el acrosoma carece de poros nucleares. En el resto de la membrana nuclear, su cara externa está fusionada con la membrana celular. En la parte posterior del núcleo se encuentra la fosa de implantación que interacciona con la pieza de conexión al flagelo.

El acrosoma es una vesícula aplastada con forma de capuchón que contienen enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa y la acrosina, que actúan sobre la zona pelúcida (ZP) del ovocito y que envuelve las dos terceras partes del núcleo del espermatozoide.

III.6.2.2 El flagelo del espermatozoide

El flagelo tiene una longitud aproximada de 50 μm y está subdividido en cuatro partes, la pieza de conexión o cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal (Junqueira y col, 1995).

La pieza de conexión es el sitio de articulación entre la cabeza y la cola (Chemes y Alvarez Sedo, 2012). Es una estructura compleja en forma de cilindro compuesta por nueve columnas longitudinales rodeadas por el capitulum (Holstein y Roosen-Runge, 1981; Chemes y col, 1999) y con una longitud de 2 μm por lo que no es visible al microscopio óptico. Contiene el distal modificado que da lugar al comienzo del axonema y el proximal que está conectado a la fosa de implantación de la cabeza del espermatozoide.

El axonema es una estructura formada por 9 pares de MTs periféricos y un par de MTs centrales que se extiende a lo largo de todo el flagelo. Los 9 pares de MTs periféricos están unidos entre sí a través de los puentes formados por las proteínas nexina mientras que el par de MTs centrales está unido a los MTs periféricos a través de extensiones radiales. En cada par de MTs, hay brazos de dineínas con actividad ATPasa involucrados en el movimiento flagelar. Cuando estos brazos son activados causan la contracción de un par de MTs dando lugar a una onda que se expande por el flagelo produciendo movimiento (Gibbons, 1965; Tash y Means, 1982).

La pieza intermedia tiene una longitud aproximada de 5 a 7 μm y se continúa con la pieza de conexión. Esta formada por el axonema rodeado por 9 pares de fibras densas externas (ODF, del término inglés “*outer dense fibers*”) que se disponen paralelas a los MTs del axonema (Edi y col, 2003) y que se originan en la parte posterior de la pieza de conexión y se continúan hasta la pieza principal. Alrededor de estas fibras se disponen de forma helicoidal una capa de mitocondrias que van a aportar parte de la energía en forma de ATP necesaria para el movimiento del flagelo.

La pieza principal es la continuación de la pieza intermedia y tiene un diámetro de menos de 1 μm y una longitud de alrededor de 40 μm . Esta compuesta por el axonema, 8 pares de ODFs, una vaina fibrosa que rodea al axonema y a las ODFs reemplazando a uno de los pares de ODF presente en la pieza intermedia. Esta vaina está formada por dos fibras longitudinales conectadas entre sí a través de unas estructuras concéntricas con forma de costillas (Edi y col, 2003).

La pieza terminal es la parte final del flagelo de unas 5 μm de longitud y 0, 25 μm de diámetro y está formado únicamente por el axonema y la membrana plasmática

que le rodea en su parte más distal. Los MTs del axonema localizados en esta zona, se disgregan y merman en número.

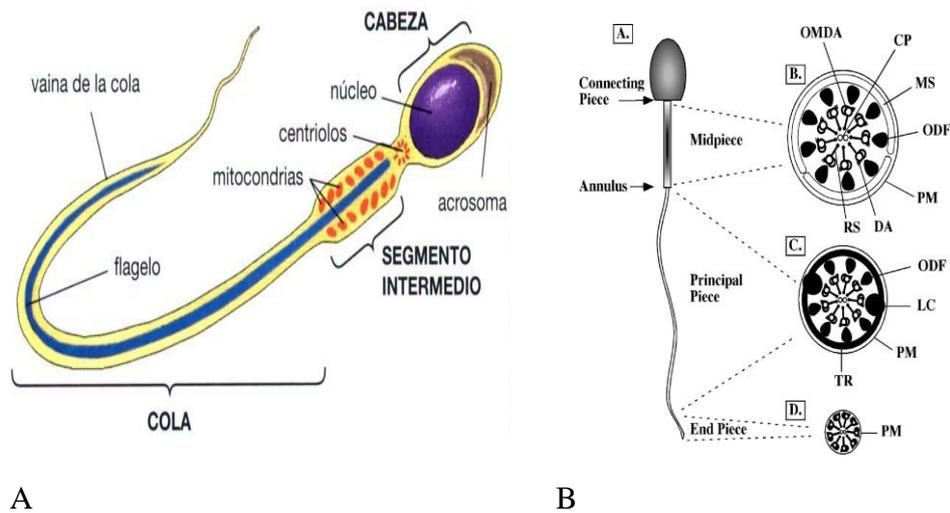


Fig. I-25: A. Esquema de las partes de un espermatozoide maduro donde se aprecian la cabeza con el núcleo y el acrosoma, la pieza intermedia con las mitocondrias y parte del flagelo y la cola formada por el flagelo y la membrana plasmática que le rodea. (<http://redpacientes.com/social/posts/view/55508/17932>). B. Esquema de la ultraestructura del flagelo del espermatozoide (Turner, 2003).

En base a todo lo expuesto anteriormente, los MTs juegan un papel muy importante tanto en la espermatogénesis, como en el espermatozoide maduro. Durante la espermatogénesis, se van a producir cambios dramáticos en la organización microtubular (Sperry, 2012) que intervienen en diferentes mecanismos tales como divisiones celulares con y sin reducción del material genético, cambios morfológicos y desplazamientos celulares. En todos estos procesos, el citoesqueleto celular participa a través de sus diferentes componentes, y entre ellos cabe destacar la participación de los MTs en los procesos de división meiótica y mitótica, formación del acrosoma, del *manchette*, y del flagelo. También participan en el transporte IFT y IMT, translocación de las espermátidas a lo largo del epitelio seminífero, en el proceso de elongación de la cabeza espermática.

En el espermatozoide adulto, los MTs forman el axonema del flagelo y los centriolos. El flagelo permite el desplazamiento del espermatozoide para que este pueda ascender por el tracto genital femenino para entrar en contacto con el ovocito y fecundarlo (Buffone y col 2013). También se cree que podría actuar como cilio sensor de tal manera que detectaría las alteraciones en el medioambiente y la presencia de

estímulos quimiotácticos respondiendo a ellos con cambios en la dirección y velocidad del movimiento y activando la reacción acrosómica mediante un segundo mensajero, calcio, desde el flagelo a la cabeza (Bloodgood, 2010; Buffone y col 2013).

Por otro lado, durante el proceso de fecundación, el espermatozoide contribuye con sus dos centriolos a formar el centrosoma del cigoto (Scahtten y Sun, 2009), ya que el ovocito humano carece de ellos probablemente para evitar la formación de husos mitóticos multipolares en la primera división mitótica del cigoto (Chatzimeletiou y col, 2008). Una vez que tiene lugar la fecundación, la pieza de conexión del flagelo se deshace y se empieza a formar alrededor de la cabeza del espermatozoide un aster de MTs desde el proximal (Sathananthan y col, 1997, Sathananthan, 1998). El ovocito finaliza el proceso de meiosis y expulsa el segundo corpúsculo polar (Tereda y col, 2010). A medida que el pronúcleo del espermatozoide se va descondensando, el aster de MTs se va alargando y envolviendo el pronúcleo masculino, para posteriormente participar en el desplazamiento de los pronúcleos de ambos gametos al centro del ovocito para que se fusionen (Tereda y col, 2010). Una vez que se ha producido la singamia de los núcleos, el centrosoma del espermatozoide recluta material pericentriolar del citoplasma del ovocito para formar posteriormente el centrosoma del cigoto que va a dirigir las primeras divisiones mitóticas (Chemes y Alvarez Sedo, 2012).

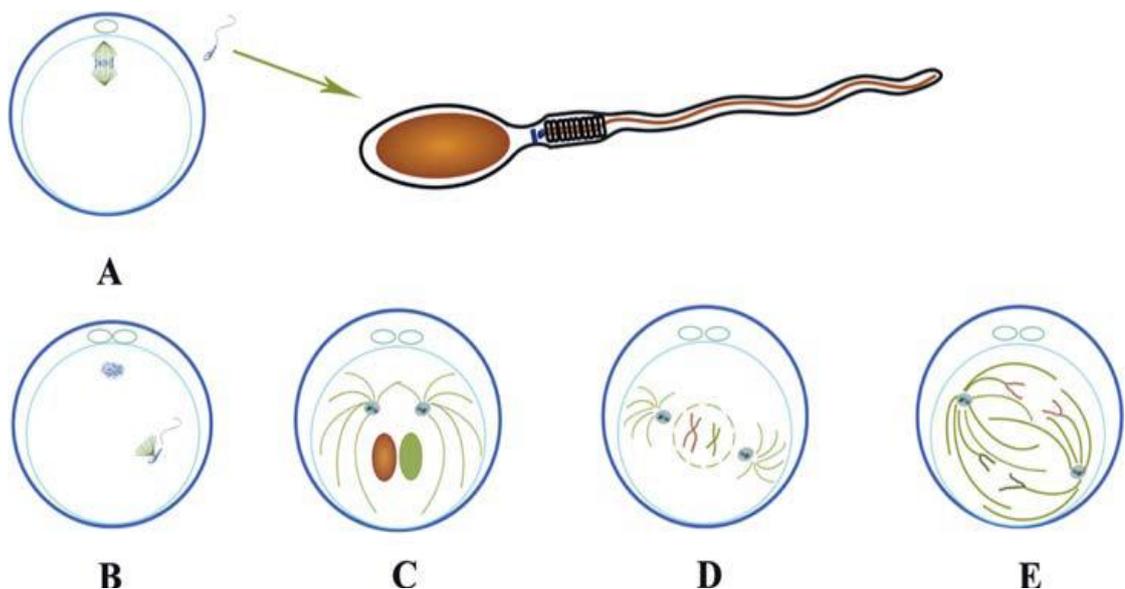


Fig. I-26: Esquema del proceso de fecundación a nivel del centrosoma del espermatozoide (Scatten y Sun, 2009)

En resumen, se puede concluir que la finalidad de todos estos procesos es dar lugar a espermatozoides que no solo puedan con éxito aportar el material genético masculino, si no que también pueda activar al ovocito para que complete su división meiótica y formar el aster que permita movilizar los pronúcleos masculinos y femeninos y que estos se fusionen (Scahtten, 1995; Simerly y col, 1995, Van Blerkom y col, 1995). En cualquiera de estos pasos, los MTs juegan un papel importante donde se va a requerir de la polimerización y despolimerización de los dímeros de tubulina y por lo tanto la participación de los TBCs. Cualquier alteración en estos procesos puede dar lugar a anomalías en los MTs que podrían estar relacionados con infertilidad masculina y anomalías en la progenie (Sperry, 2012) ya que pueda originar espermatozoides con anomalías cromosómicas, defectos en la condensación de la cromatina, hipoplasias acrosómicas, alteraciones de los centriolos, anomalías en el flagelo etc. (Chemes y Alvarez Sedo, 2012).

III.6.3 Ovocitos:

Los ovocitos son células especializadas que aportan al embrión la mitad del material genético y una gran reserva de proteínas, ARNm y orgánulos que van a suplir los requerimientos funcionales, nutricionales y energéticos en los primeros estadios del desarrollo embrionario (Austin, 1982; Browder, 1981; Davidson, 1986). Por este motivo, es imprescindible que durante su formación ocurra tanto la maduración del pronúcleo (meiosis) como la del citoplasma y para ello es necesario que tengan lugar dos procesos complejos, ovogénesis y foliculogénesis, que están estrechamente ligados entre sí.

En el cortex del ovario se encuentran localizados los folículos, que son la unidad funcional y están formados por una o varias capas de células de la granulosa que rodean al ovocito en formación aportando el ambiente adecuado para que esté pueda llegar a convertirse en un ovocito maduro (Gougeon, 1996; Zeleznik, 2004; Loutradis y col, 2006; Gosden y Lee, 2010). A su vez el ovocito va a aportar diferentes compuestos como por ejemplo GDF9 (del término inglés “*growth differentiation factor 9*”) y BMP15 (del término inglés “*bone morphogenetic protein*”) (Gilchirst y col, 2008; Edson y col, 2009; Gosden y Lee, 2010) que junto con las hormonas femeninas van a inducir cambios en la estructura del folículo durante su desarrollo (foliculogénesis).

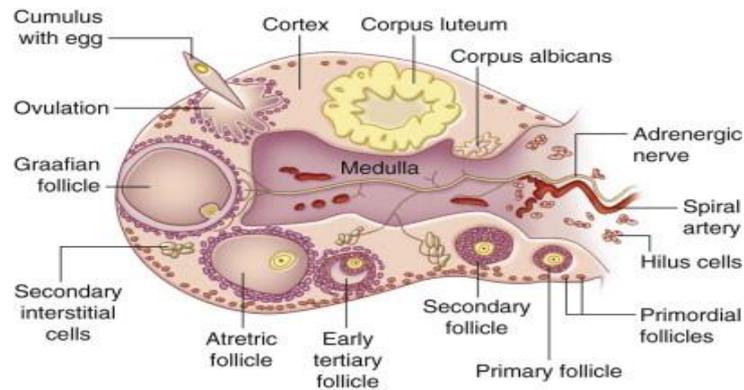


Fig.I-27: A. Esquema de ovario donde se observa la presencia de folículos en diferentes estadios de crecimiento en el córtex del ovario (Erickson GF, 1995).

Tanto la foliculogénesis como la ovogénesis, comienzan durante el desarrollo embrionario del ovario con el reclutamiento de las células germinales que posteriormente son transformadas en ovocitos inmaduros. A continuación tendrá lugar una etapa de reposo o quiescencia que se extenderá desde el nacimiento hasta la pubertad. A partir de este momento, con cada ciclo menstrual, el sistema hormonal femenino coordinará a través del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, el crecimiento de una serie de folículos que culminará con la liberación u ovulación de un único ovocito a las trompas de Falopio hasta que se agote la reserva ovárica coincidiendo con la menopausia.

III.6.3.1 Foliculogénesis:

La foliculogénesis se inicia alrededor de la semana 20 de gestación, cuando los ovocitos inmaduros son rodeados por una capa de células de la pregranulosa, aplanadas, sin actividad mitótica y separadas del estroma ovárico por una membrana basal dando lugar a la formación del folículo primordial (Fábregas y col, 2009). A lo largo del desarrollo y crecimiento de los folículos, se distinguen cuatro fases de requerimientos diferentes de estimulación por las gonadotropinas (*FSH*, del término inglés “Follicle-stimulatin hormone” y *LH*, del término inglés “*Luteinizing hormone*”) (Fábregas y Balasch, 2009).

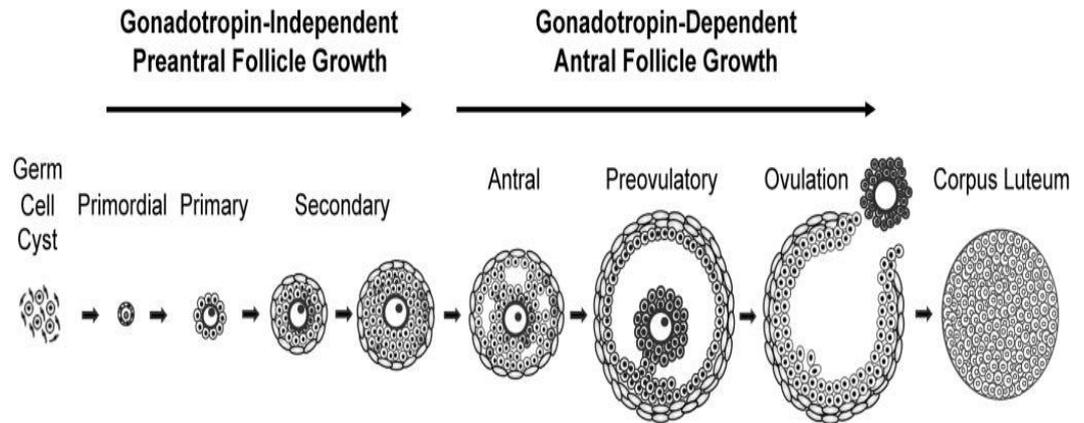


Fig. I-28: Esquema resumen de las diferentes fases de la foliculogénesis. Una primera fase gonadotropina independiente seguida de una fase gonadotropina dependiente. (Edson y col, 2009).

1. Fase inicial de crecimiento independiente de gonadotropinas que tiene lugar asiduamente desde el nacimiento hasta la menopausia.

Periódicamente y de forma regular y continua, algunos folículos primordiales son estimulados por factores intraováricos y/o desconocidos a entrar en crecimiento mientras que el resto de los folículos permanecerán en quiescencia durante meses o años (Monzo y col, 2008, Fábregues y Balasch, 2009). Aquellos folículos que inicien su crecimiento durante la infancia sufrirán procesos de atresia ya que los niveles séricos de gonadotropinas serán insuficientes para que puedan continuar con su crecimiento. Este hecho causará la disminución drástica de la población folicular de 500.000 al nacer a 50.000 en el momento de la pubertad (Hartshorne y col, 2009).

En aquellos folículos primordiales en los que el crecimiento continúe, las células pregranulosas se convertirán en células de la granulosa (CGs) con forma cuboide y alta actividad mitótica transformándose en un folículo primario (folículo preantral). Estas células van a secretar mucopolisacaridos que contribuirán a la formación de la zona pelúcida (ZP), capa de glicoproteínas dispuesta en forma de malla alrededor del ovocito. A medida que el ovocito va creciendo y las capas de CGs como mínimo sean tres, el folículo primario se transforma en folículo preantral multilaminar o folículo secundario. Al mismo tiempo, por fuera de la membrana basal y a partir del estroma ovárico se diferencia una capa de células que constituirá la teca. A partir de este momento, las células de la granulosa presentan receptores de la hormona *FSH*, y los folículos entraran en la siguiente etapa de la foliculogénesis.

2. Fase de crecimiento folicular dependiente de estimulación tónica de la FSH.

La *FSH* va a interactuar con sus receptores en la membrana de las CGs estimulando la división celular y un aumento en la producción y secreción extracelular de glicosaminoglicanos (Murdoch, 2000) dando lugar a la formación de espacios extracelulares entre las CGs que terminan fusionándose en un único espacio denominado antro folicular (folículo antral) (Monzo y col, 2008; Fábregues y Balasch, 2009).

Por otro lado las células de la teca van a aumentar su población diferenciándose en dos capas, teca interna y teca externa. Las células tecales próximas a la membrana basal de las CGs forman la teca interna y se caracterizan por ser células esteroidogénicas con receptores para *LH*. Mientras que las células tecales periféricas se unen a las células del estroma dando lugar a la teca externa. Este paso, va a ir acompañado de procesos de angiogénesis que van a permitir que el folículo secundario quede expuesto a través de la sangre a las gonadotropinas (*FSH* y *LH*), insulina, inhibina y otras hormonas (Chang y Erikson, 2010).

Se va crear una estrecha relación entre el ovocito y las CGs próximas a él (*corona radiata*) mediante la formación de uniones intracelulares de tipo gap entre las prolongaciones citoplasmáticas de las CGs que atraviesan la ZP y la superficie del ovocito que van a permitir a las CGs ejercer un efecto inhibitorio de la meiosis (Gilula y col, 1978; Thibault y col, 1987; Albertin y col, 2001) sin afectar al crecimiento del ovocito. A través de estas uniones se van a realizar el intercambio entre el ovocito y las CGs de diferentes moléculas (AMPc, aminoácidos, ribonucleótidos, etc), y señales paracrinas o autocrinas como los factores de crecimiento *GDF-9*, *BMP15*, *TGFβ* (del término inglés “*Transforming growth factor beta*”) (Albertin y col, 2001; Gilchrist y col, 2008). En este tipo de transporte va a ser clave la acción de los MTs presentes en las prolongaciones de las células de la granulosa debido a su capacidad de participar en el desplazamiento y transporte de orgánulos (Albertini y col, 2001).

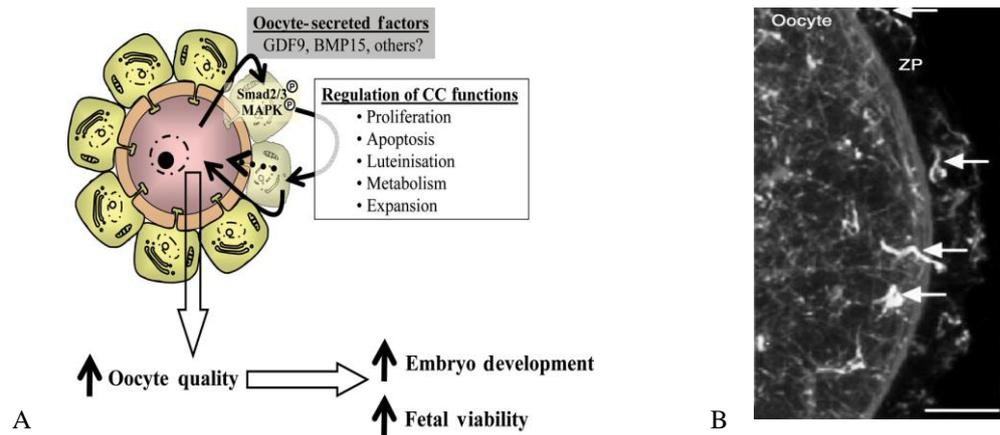


Fig.I-29: A. Esquema de la comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa a través de las uniones tipo gap (Gilchrist y col, 2008). B. Imagen de Microscopia confocal de un folículo preantral de ratón donde se detectan los MTs (flechas) que forman parte de las prolongaciones citoplasmáticas de las células de la granulosa que forman las uniones de tipo gap con el ovocito (Albertini y col, 2001).

El crecimiento del folículo antral, que en la especie humana dura entre unos 50 y 60 días, seguirá dependiendo de la acción tónica de la *FSH* hasta que alcance un diámetro aproximado de unos 5 mm (Fábregues y Balasch, 2009). A partir de ese momento siempre y cuando los niveles de *FSH* sean los adecuados podrá continuar con la siguiente fase de maduración.

3. Fase de maduración o crecimiento folicular dependiente de gonadotropinas (*FSH* y *LH*) que se inicia en la pubertad con cada ciclo menstrual.

La elevación interciclo de los niveles séricos de *FSH* (Fábregues y Balasch, 2009) induce el reclutamiento de un número limitado de folículos antrales (entre 6 y 12) que iniciaran la fase de maduración preovulatoria. La acción de la *FSH* sobre las CGs induce su crecimiento acelerado, que irá acompañado de la síntesis de receptores de *LH*, estradiol e inhibina. El aumento de los niveles en sangre de estas dos hormonas, ejercerá un *feedback* negativo sobre la adenohipófisis produciendo una bajada de los niveles de *FSH* sérico. De todos los folículos reclutados, el que sea capaz de responder a la disminución de los niveles de *FSH*, se convertirá en el folículo dominante o folículo de Graaf que continuara creciendo mientras que el resto de los folículos se atresian.

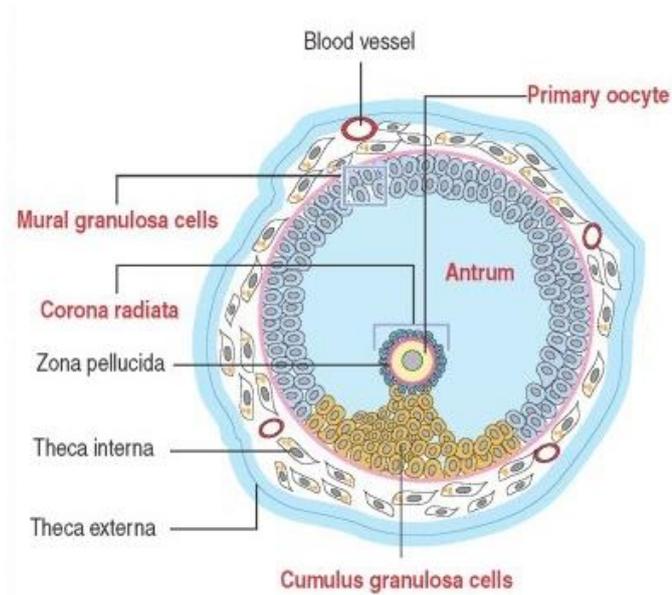


Fig.I-30: Esquema de un folículo de Graaf (Kierszenbaum y Abraham L., M.D, en Speroff y Frtitz, 2006).

4. Ovulación:

Cuando el folículo dominante alcanza un tamaño de 14-16 mm, aumenta la secreción de estradiol que deriva en un aumento de los niveles de estradiol sérico. El aumento de esta hormona, ejerce un *feedback* positivo sobre la adenohipófisis dando lugar al pico de *LH* preovulatorio que suprime la división de la células de la granulosa y activa la expresión de los genes implicados en la rotura por proteólisis de la pared del folículo (Fábregues y Balasch, 2009) A las 16-20 horas después del pico de *LH*, se producirá la liberación del ovocito rodeado por la corona radiata a la cavidad abdominal donde será captado por las fimbrias de las trompas de Falopio.

III.6.3.2 Ovogénesis:

El proceso de ovogénesis se inicia durante el desarrollo embrionario y continúa hasta la edad adulta de la mujer y al igual que pasa con los espermatozoides, la formación de un ovocito maduro requiere de la división meiótica de las células madres u oogonias para obtener una célula haploide pero con dos particularidades que no tienen lugar durante la espermatogénesis. Por un lado, van a tener lugar dos fenómenos de quiescencia, uno que va desde el desarrollo embrionario hasta el momento de la

ovulación en la edad adulta (PI) y otro que va desde la ovulación hasta el momento de la fecundación (MII). Y por otro lado, se trata de una división celular asimétrica donde de una célula diploide se va a formar un único gameto haploide ya que el material genético sobrante va a ser eliminado en forma de corpúsculos polares (CPs).

Se pueden distinguir diferentes etapas:

- 1- Formación del ovocito primario
- 2- Maduración ovocitaria
- 3- Formación del ovocito secundario
- 4- Fecundación

1 Formación del ovocito primario:

Comienza con la migración de las células germinales primordiales (CGPs) desde la pared del saco vitelino hacia la cresta genital entre la 3ª y 5ª semana de gestación donde continúan dividiéndose por mitosis (Baker y Franchi, 1967). En la 9ª semana, se produce la diferenciación gonadal de las crestas genitales en ovarios, y a partir de este momento las CGPs se transforman de forma paulatina en oogonias (Wassarman y Albertini, 1994; García y Ponsa, 2003), las cuales tienen mayor actividad mitótica que sus progenitoras.

En el cuarto mes de gestación, las oogonias de forma asincrónica van entrando en meiosis dando lugar a la formación de ovocitos primarios (ovocito I), quedando estos quiescentes en la fase de diploteno de la PI (Loutradis y col, 2006). Durante esta etapa de la meiosis, tendrá lugar la formación y apareamiento de los cromosomas homólogos, procesos de recombinación del material genético, y por último en la fase diploteno ocurrirá la separación de los cromosomas bivalentes. En este momento, el ovocito I quedará en una fase de transición llamada diascinesis que se caracteriza por la presencia de una membrana nuclear intacta denominada Vesícula Germinal (VG) que rodea a la cromatina que se encuentra dispuesta en forma de red de anclaje y un nucleolo prominente donde tiene lugar la síntesis de ARN ribosomal (Langman y Sadler, 2004; Golden y Lee, 2010).

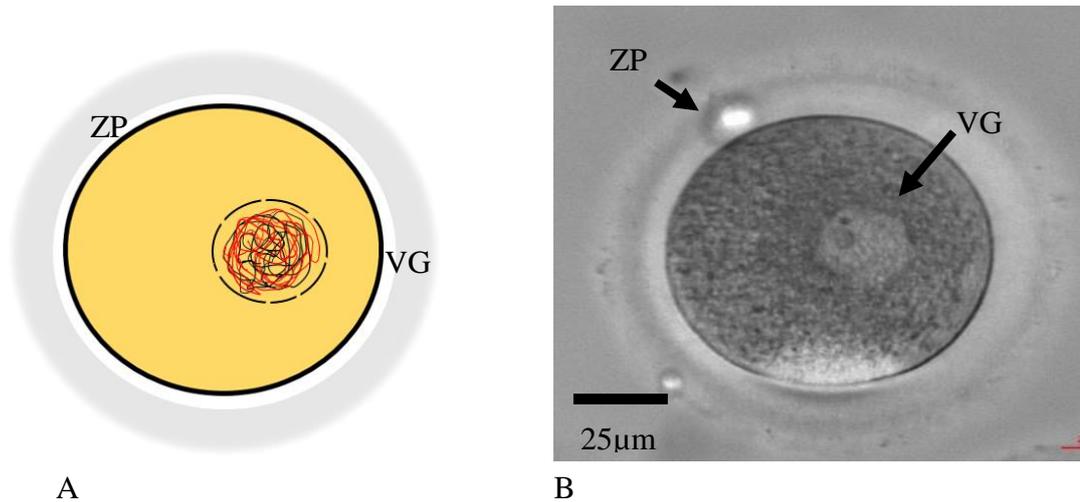


Fig.I-31: A. Esquema representativo de un PI donde se observa una VG en cuyo interior el material genético se dispone en forma de red y la ZP compuesta por glicoproteínas que rodea a la estructura del ovocito. B. Imagen de Microscopia óptica de contraste de fases de un ovocito en PI, donde se aprecia la presencia de la ZP y la VG con un nucleolo prominente

Los ovocitos primarios permanecerán en el estadio de PI hasta el momento de su ovulación, aproximadamente de 13 a 50 años (pubertad-menopausia) después de su formación. El arresto meiótico es regulado por los niveles de AMPc en el interior del ovocito (Conti y col, 2002; Eppig y col, 2004). El AMPc es producido por las células de la granulosa y transferido al interior del ovocito a través de las uniones gap ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la meiosis (Mehlmann, 2005, Zuccotti y col, 2013). Los mecanismos exactos a través de los cuales los niveles elevados de AMPc regulan el arresto meiótico se desconocen aunque ha sido demostrado que afectan a la actividad del Factor Promotor de meiosis o mitosis (PMF, CDK/cyclin B) induciendo la fosforilación de la subunidad CDK (Mehlmann, 2005).

Al formarse los ovocitos I, se observa una nube densa de orgánulos formada por mitocondrias, AG y retículo endoplasmático (ER) que desaparece una vez que el ovocito empieza a crecer en diámetro (120 μm), volumen (100 veces) y a aumentar en número de orgánulos, estructuras y componentes solubles (Wassarman y Josefowicz, 1978; Gosden y col, 1997; Gosden y Lee, 2010). El AG se descompone en una especie de sacos o vesículas planas que se distribuyen por el cortex del ovocito, y que están implicadas en la formación de los gránulos corticales. El RE presenta un disposición que asemeja a una colmena y se produce un incremento en el número de poliribosomas (4X) distribuidos por el citoplasma, asociado al incremento en la síntesis de proteínas

(Gosden y Lee, 2010). Y las mitocondrias se acumulan alrededor de la VG (Van Blerkom, 1991; Yu y col, 2010).

Durante la fase de paquiteno en la PI, los centríolos desaparecen quedando en el citoplasma del ovocito primario restos de material pericentriolar que contiene MTOCs (Mandelbaum y col, 2004). Se cree que la desaparición de los centríolos podría ser el mecanismo utilizado para asegurar la correcta formación del centrosoma después del proceso de fecundación ya que cada gameto aportaría diferentes componentes (Delattre y Gönczy, 2004; Howe y Fitzharris, 2013) y para prevenir los fenómenos de partenogénesis ya que aquellos ovocitos que no hayan sido fecundados por un espermatozoide, carecerán de los centríolos adecuados para continuar con el desarrollo embrionario (Manadhar y col, 2005).

A nivel molecular, va a existir un incremento en la síntesis de ARNm alcanzando su máximo nivel justo antes de que se produzca la rotura de la VG donde cesa la transcripción y se reanuda el proceso de meiosis (Piko y Clegg, 1982; Bachvarova y col, 1985; Swain y Pool, 2008). A partir de este momento, la regulación de la expresión génica queda bajo el control de la síntesis de proteínas en vez de la transcripción (Gosden y Lee, 2010). Y aunque una gran mayoría de los ARNm son traducidos a proteínas, otros son almacenados en unas estructuras ribonucleo-proteica hasta que sean utilizados durante la maduración del ovocito, fertilización, y por el cigoto hasta el estadio de 6 a 8 células donde tiene lugar la activación de su genoma (Mehlmann, 2012). Estas partículas serán transportadas a diferentes localizaciones subcelulares por proteínas motoras unidas a MTs (Jansen y Niessing, 2012).

2 Maduración ovocitaria:

Es un proceso largo que se inicia con el pico de gonadotropinas que tiene lugar a la mitad del ciclo menstrual (Gosden y Lee, 2010) y que consiste en la transición del estadio de VG o PI al de MII con la extrusión del primer CP (Loutradis y col, 2006) y la desaparición de las uniones Gap entre el ovocito y las células de la granulosa. Comprende cambios tanto en el núcleo como en el citoplasma. A nivel del núcleo se va a producir la rotura de la VG, condensación y segregación de los cromosomas (Yu y col, 2010) y a nivel del citoplasma va a tener lugar la reorganización de los orgánulos, aumento en los niveles de Ca^{2+} almacenado y antioxidantes y almacenamiento de

ARNms y proteínas (Guerin y col, 2001; Ferreira y col, 2009; Yu y col, 2010). Todos estos cambios van a estar regulados por modificaciones en histonas, proteínas centrosomales, kinasas, fosfatasas y citoesqueleto (Sun y col, 2001; Wang y col, 2006; Saskova y col, 2008; Schindler y col, 2009; Solc y col, 2008; Yin y col, 2008). A nivel del citoplasma va a tener lugar la reorganización de los orgánulos, donde los MTs y las proteínas motoras asociadas a ellos van a jugar un papel fundamental (VanBlerkom and Runner, 1984; Van Blerkom, 1991; Mehlmann y col., 1995; FitzHarris et al., 2007).

Con la desaparición de las uniones Gap entre el ovocito y las células de la corona radiata, se finaliza el suministro de ATP y piruvato por parte de las células de la granulosa al ovocito y es a partir de este momento, cuando el ovocito tiene que subsistir con el ATP que sintetizan sus mitocondrias. Coincidiendo con la rotura de la VG (*GVBD*, del termino inglés “*Germinal vesicle breakdown*”), las mitocondrias van a aumentar en número y se van a distribuir alrededor del núcleo (Thibault y col, 1987). Se estima que el número de mitocondrias presente en el ovocito humano en el momento de la fertilización será alrededor de 10.000 a 100.000 (Jansen, 2000). A medida que el ovocito vaya madurando, con la ayuda de los MTs, las mitocondrias se van a dispersar por todo el citoplasma (Dumollard, 2006) probablemente con la intención de hacer llegar el ATP a aquellas regiones del citoplasma donde tengan lugar procesos que requieran mayor consumo de energía tales como la formación del huso meiótico, desplazamiento de los cromosomas etc. (Van Blerkom, 1991). En ovocitos de ratón se ha observado que las mitocondrias son transportadas por MTs a la región perinuclear para formar una nube que rodea a los cromosomas bivalentes y posteriormente a las placas metafásicas I y II (Van Blerkom y Runner, 1984; Tokura y col, 1993). Los MTs se originan a partir de los MTOC próximos a la zona perinuclear (Van Blerkom, 1991).

El RE que es el mayor reservorio de Ca^{2+} necesario en el momento de la fertilización (FitzHarris y col, 2007) va a formar acumulaciones de 2-3 μ m localizadas en el interior y cortex del ovocito (Mann y col, 2010). En el estudio realizado por el grupo de FitzHarris (2007) en ovocitos de ratón, se describió que parte de la reorganización y desplazamiento del RE durante la maduración de los ovocitos era llevada a cabo por MTs y las proteínas motoras dineínas, siendo un punto clave en la reorganización del citoplasma necesaria para que pueda tener lugar el proceso de fertilización. También van a ser desplazados los gránulos corticales que van a aumentar

en número y migran hacia el cortex del ovocito al igual que el AG que exportará glicoproteínas a la ZP (Picton, 1998).

A nivel del núcleo, el pico de *LH* va a inducir la reiniciación del proceso de meiosis. Al desaparecer las uniones Gap, va a tener lugar la disminución de los niveles de AMPc en el ovocito que van a conducir a través de una cascada de fosforilaciones a la rotura de la vesícula germinal, condensación de los cromosomas y la activación de MPF y MAPK (del término inglés “*mitogen-activated protein kinase*”) (Swain y Pool, 2008; Zuccotti y col, 2011). A continuación, tendrá lugar la formación acentriolar del primer huso meiótico desde el interior (cromosomas) hacia el exterior (polos del huso) al contrario de lo que ocurre en la formación de los husos cuando los centríolos están presentes (Howe y Fitzharris, 2013).

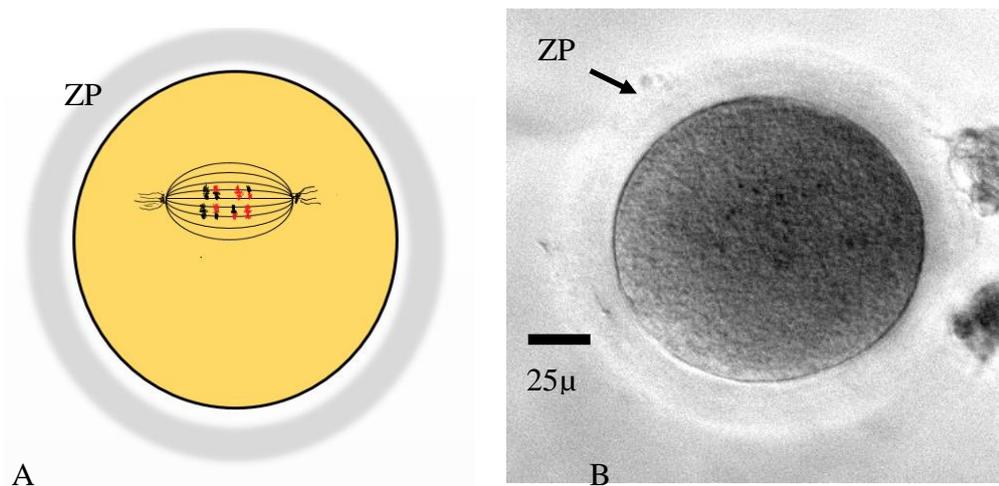


Fig.I-32: A. Esquema representativo de un MI en cuyo citoplasma se encuentra el primer huso meiótico donde los cromosomas se encuentran unidos a los MT del huso a través de sus centrómeros. B. Imagen de microscopía óptica de contraste de fases de un ovocito en MI, donde no se aprecia ni la presencia de la VG en el citoplasma ni la del CP en el espacio perivitelino.

El mecanismo exacto que conduce a la formación de este huso acentriolar se desconoce, aunque se cree que intervienen MTOCs y los cromosomas que también poseen la capacidad de actuar como MTOCs. Los MTOCs tal y como se ha comentado anteriormente van a ser acentriolares y contienen numerosas proteínas centrosomales tales como la γ -tubulina, centrina, y NuMA (del término inglés “*Nuclear Mitotic*

Apparatus”) (Schatten y col, 2012). Los cromosomas a través del factor regulador de la condensación de cromatina (RCC1) van a contribuir a la creación y mantenimiento de un gradiente Ran-GTP que favorece y estabiliza la polimerización de los MTs (Caudron y col, 2005; Maddox y col, 2012; Liu, 2012).

Los trabajos realizados por Battaglia y col (1996) y Nam-Hyung y col (1998) parecen apoyar la hipótesis propuesta por Schatten y col (1986) y Kim y col (1996) donde se propone la existencia de material cetrosomal asociado a la membrana nuclear de la VG que formara MTOC cuando esta se rompa. Al producirse la rotura de la VG (VGBD, del término inglés “*germinal vesicle breakdown*”) algunos MTOCs próximos a los cromosomas darán lugar a la formación de un grupo de MTs en forma de esfera (Howe y FitzHarris, 2013). Los cromosomas interaccionaran con los MT a través de los cinetocoros y se dispondrán en forma de hilera dando lugar a la placa metafásica. A partir de ese momento, los MTOCs se organizan en dos extremos opuestos de la esfera de MTs formándose los dos polos del huso, los cuales se separan a medida que los MTs crecen en longitud al ir añadiéndose subunidades de tubulina al extremo + de los MTs (McIntosh y Euteneuer, 1984; Mandelbaum y col, 2004). Como resultado de este proceso, se origina un huso meiótico en forma de barril (12 x 9 μm) compuesto por MTs, proteínas asociadas a MTs, y proteínas pericentriolares como pericentrin, aurora-A y NuMa entre muchas otras (Wittmann y col, 2001; Fant y col, 2004).

Al final de la MI, el huso meiótico se desplaza al cortex del ovocito, y comienza la anafase con la segregación y separación de los cromosomas homólogos a los polos opuestos del huso. A continuación, el ovocito entra en la telofase I donde tiene lugar una citocinesis desproporcionada y la extrusión de la mitad del material genético en forma de CP (Swain y Pool, 2008; Brunet y Verlhac, 2011).

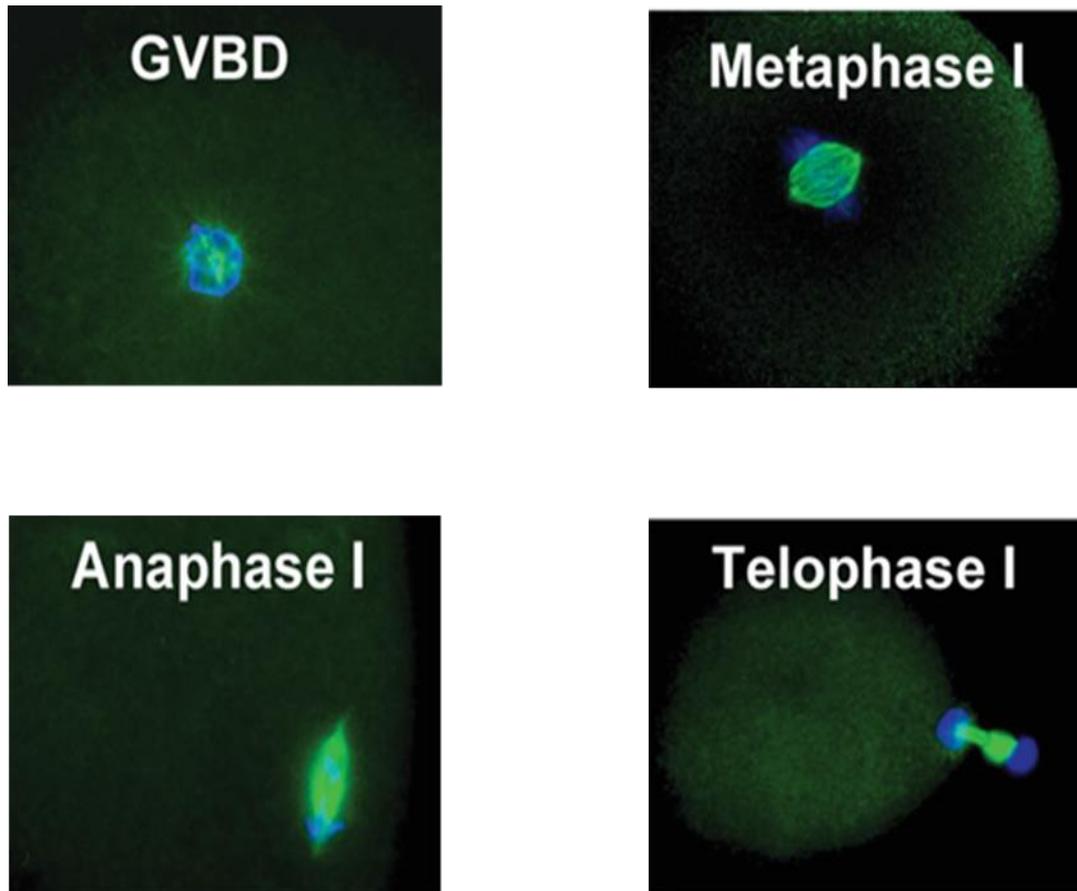


Fig.I-33: Fotos de inmunofluorescencia realizadas con Microscopía Confocal por Swain y Pool, 2008 donde se observan los cambios que experimentan los cromosomas (azul), y MTs (verde) durante la primera división meiótica en ovocitos humanos, y se aprecia la formación acentriolar del huso meiótico en la MI seguida de la extrusión del primer CP durante la telofase (Swain y Pool, 2008).

3 Formación ovocito secundario:

Tras la expulsión del primer corpúsculo polar, el ovocito primario se convierte en ovocito secundario al entrar rápidamente en la segunda división meiótica donde va a tener lugar el segundo bloqueo meiótico en MII que al igual que el primero va a estar regulado por los niveles de MPF (Ledan y col, 2001; Perry y VerLHac, 2008). La segunda división meiótica, se caracteriza por la ausencia de la replicación de ADN y una profase muy breve que continua con la formación del segundo huso meiótico bipolar por debajo del CP y que se encuentra perpendicularmente anclado a la membrana plasmática (Dumont y col, 2007; Brunet y col; 2008; Mandelbaum y col, 2004).

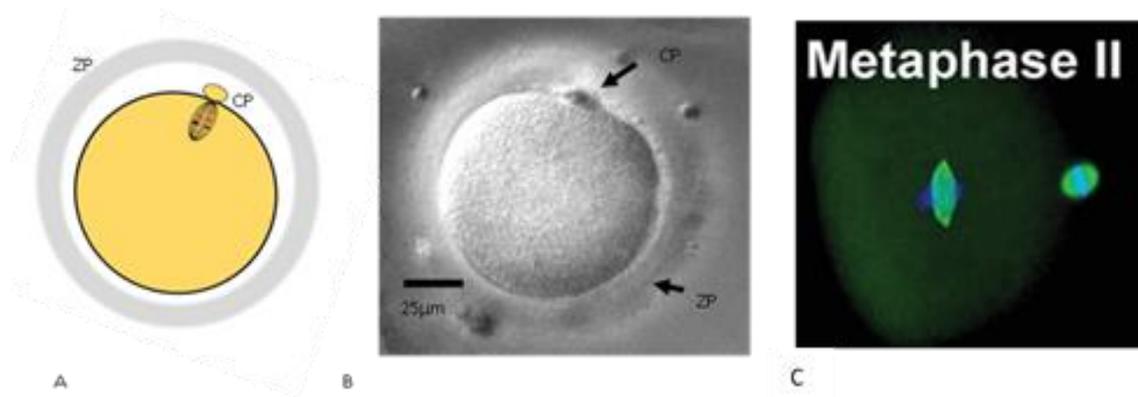


Fig.I-34: A. Esquema representativo de un MII en cuyo citoplasma próximo a la membrana plasmática se encuentra el segundo huso meiótico conectado al CP. Como parte del proceso de meiosis, el ovocito inmaduro con 23 pares de cromosomas se divide en dos células de tamaños muy desiguales, el ovocito y el CP. C. Fotografía de microscopía confocal de un ovocito en MII donde se observa el huso meiótico y el corpúsculo polar (Swain y Pool, 2008). B. Fotografía de microscopio óptico de un ovocito en MII donde se aprecia el CP (Veeck y Zaninovic, 2003).

4 Fecundación:

A las 16-20 h después del pico de *LH*, se producirá la liberación del ovocito rodeado por la corona radiata que será captado por las fimbrias de las trompas de Falopio cuyo epitelio está formado en parte por células ciliadas que facilitan el desplazamiento del ovocito por las trompas. Si en las próximas 12-24 horas, el ovocito entra en contacto con espermatozoides capacitados y se dan las condiciones adecuadas tendrá lugar el proceso de fecundación que activará la reanudación de la meiosis en el ovocito.

Una vez que el espermatozoide maduro interacciona con la ZP del ovocito y tiene lugar la reacción acrosómica, se produce la fusión de las membranas plasmáticas de ambos gametos dando lugar a incrementos periódicos y oscilatorios de Ca^{2+} intracelular libre en el ovocito procedente en su mayor parte del RE (Clift y Schuh, 2013). Estas variaciones en los niveles de Ca^{2+} , van a inducir la reanudación del proceso de meiosis dando lugar a la formación de un ovocito maduro con 23 cromosomas dispuestos en un núcleo vesicular o pronúcleo y a la extrusión del segundo CP. También, los niveles de Ca^{2+} son responsables de la reacción cortical para evitar la poliespermia, síntesis de proteínas a partir del ARNm maternos, así como la transición de meiosis a mitosis (Ducibella y col, 2002; Horner y Wolfner, 2008).

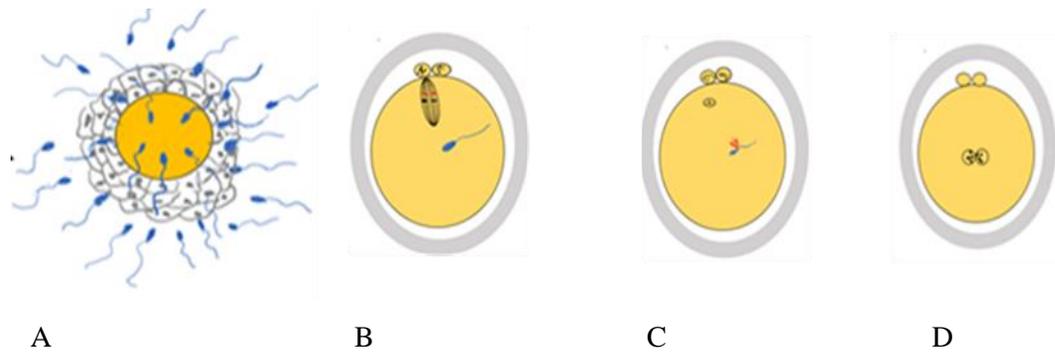


Fig.I-35: Esquema representativo de las etapas del proceso de fecundación. A. Los espermatozoides interactúan con el ovocito en MII y una vez que tiene lugar la entrada de uno de ellos en el ovocito, este reanuda el proceso de meiosis y expulsa el segundo CP (B). A continuación tendrá lugar la formación de los pronúcleos y del aster de MTs a partir del centriolo proximal del espermatozoide que será responsable de la aproximación de los pronúcleos (C y D).

En base a todo lo expuesto anteriormente, se puede concluir que el desarrollo necesario para que tenga lugar la formación de un ovocito maduro es complejo, largo en el tiempo y requiere de diferentes sistemas endocrinos, paracrinos y autocrinos que regulen y coordinen los diferentes eventos que tienen lugar durante la foliculogénesis y la ovogénesis. Además durante la ovogénesis va a tener lugar la maduración tanto del citoplasma como del núcleo. En ambos procesos, los MTs van a participar tanto en la reorganización de los orgánulos en el citoplasma como en la formación de los husos meióticos donde se va a requerir de la polimerización y despolimerización de los dímeros de tubulina y por lo tanto de la participación de los TBCs. Cualquier alteración en los TBCs podría derivar en anomalías en los MTs y por lo tanto en los ovocitos ya que la polimerización de MTs aberrantes o la despolimerización de los MTs afectarían a los husos meióticos y al transporte de orgánulos y diferentes moléculas.

Estas alteraciones por un lado, podrían impedir la correcta segregación de las cromosomas resultando en la formación de ovocitos aneuploides (Li y col, 2006, Vogt y col, 2008). Por ejemplo, se ha visto que errores en la segregación de los cromosomas durante la MI pueden causar trisomías del cromosoma 21 y alteraciones en las funciones del huso meiótico en los MII, originan anomalías en el desarrollo pudiendo causar abortos, enfermedades y alteraciones en el desarrollo embrionario (Hassold y Hunt, 2001; Miao y col, 2009).

Por otro lado, también podrían causar la reorganización anómala de ciertos orgánulos como el RE responsable de la liberación de Ca^{2+} necesario para la finalización del proceso de meiosis, la reacción cortical (Ducibella y col, 2002; Horner

y Wolfner, 2008) o de las mitocondrias responsables de la síntesis del ATP necesario para que tenga lugar tanto la maduración nuclear como la del citoplasma (Krisher y Bavister, 1998; Stojkovic y col, 2001). Alteraciones en la distribución espacial de las mitocondrias podrían estar relacionadas con alteraciones en la formación y organización de los husos meióticos, segregación de los cromosomas así como anomalías en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Van Blerkom, 2004). De hecho se ha observado que una densidad reducida de mitocondrias alrededor del espacio perinuclear está asociada a la incapacidad de formar el huso meiótico durante la MI en ovocitos de ratón (Van Blerkom, 1991) y que niveles bajos de ATP durante la maduración del ovocito pueden causar alteraciones en el desarrollo embrionario (Van Blerkom y col, 1995).

En resumen, durante la gametogénesis, los MTs van a participar formando tanto estructuras estables en el tiempo como el flagelo y centríolo de los espermatozoides como estructuras transitorias como el *manchette* o los husos mitóticos y meióticos de las células germinales, los espermatozoides y los ovocitos. A través de estas estructuras van a participar en la recombinación y segregación del material genético para obtener a partir de una célula diploide una célula haploide así como en los procesos de morfogénesis de los gametos implicados en la maduración del citoplasma, reorganización y transporte de orgánulos y moléculas y en la formación de estructuras como el acrosoma o el flagelo así como en el desplazamiento de los espermatozoides por el tracto genital femenino en busca del ovocito a fecundar. En todos estos procesos va a tener lugar la reorganización de estructuras del citoesqueleto, donde los TBCs son imprescindibles y alteraciones en estas proteínas estarían relacionadas con anomalías en los MT que podrían conducir a la formación de gametos anómalos que darían lugar a embriones no viables o a embriones con anomalías que podrían tener consecuencias nefastas en la calidad de vida del ser vivo que se origine a partir de ellos. Embriones originados a partir de espermatozoides u ovocitos aneuploides son la mayor causa de abortos espontáneos (Bond y Chandley, 1983) y aquellos embriones que llegan a término con un número alterado de cromosomas sufren de desórdenes genéticos asociados a malformaciones congénitas, retraso mental y corta expectativa de vida (Fitzpatrick, 2005; Pont y col, 2006). Por lo tanto, el estudio de los TBCs en los gametos humanos pueda aportarnos en un futuro información sobre la formación y el

funcionamiento de los gametos y embriones humanos así como posibles causas de esterilidad y en un futuro buscar terapias que permitan solucionar estos problemas.

IV OBJETIVOS

- Determinar la localización de los cofactores de la tubulina D y E en espermatozoides humanos de eyaculado y testículo.
- Determinar la localización de los cofactores de la tubulina D y E en los ovocitos humanos y en sus diferentes estadios de maduración (Profase I, Metafase I y Metafase II), y valorar sus posibles funciones.
- Determinar la presencia de los ARNm de los cofactores de la tubulina en los gametos humanos.
- Evaluar haplotipos ligados al “*síndrome del enfermo de los TBCs*” en pacientes con problemas de fertilidad.

V MATERIALES Y MÉTODOS

NOTA:

Este proyecto fue aprobado por el “Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Servicio Cántabro de Salud en el año 2008 y posteriormente fue ampliado en el año 2013 quedando registrado con el código interno del CEIC como 2008.0047, acta nº3/2008 y acta 11/2013. El material biológico utilizado para realizar el estudio ha sido donado por pacientes de la Unidad de Reproducción Asistida entre los años 2008 y 2014.

Durante los años de realización de esta tesis doctoral, en los laboratorios de la Facultad de Medicina de Cantabria realizamos estudios para intentar determinar la presencia y localización de los cofactores del plegamiento de la tubulina TBCD y TBCE en los gametos humanos. Para ello trabajamos con el material biológico donado por pacientes de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Es importante señalar que a la hora de realizar este trabajo, nos hemos encontrado con un factor limitante importante que ha sido la obtención de una cantidad elevada de ovocitos, ya que son considerados material de alto valor biológico. Por un lado, para su obtención la paciente se tiene que someter a un tratamiento médico y una leve intervención quirúrgica con las complicaciones y riesgo que estos procesos conllevan. Y por otro lado, a esto hay que añadir que los ovocitos donados por las pacientes, son los ovocitos sobrantes o bien porque eran inmaduros o bien porque no habían fecundado. Por estos motivos, se requirieron periodos largos de tiempo para almacenar suficientes ovocitos en las condiciones adecuadas para poder realizar ciertos experimentos con ellos y la calidad de las muestras puede haberse visto comprometida.

V.1 Materiales:

V.1.1 Soluciones, reactivos y fármacos:

V.1.1.1 Estimulación ovárica: FÁRMACOS

- Agonista de GnRH, (Procrin® Laboratorios Abbott)
- Antagonistas de GnRH (Cetrotide® Laboratorios Merck; Orgalutran® Laboratorios MSD)
- *FSH* recombinante (Gonal-F® Laboratorios Merck; Puregon® Laboratorios MSD)
- *FSH* recombinante y *LH* recombinante (Pergoveris® Lab. Merck)
- *FSH* urinaria y *LH* urinaria (Menopur® Laboratorios Ferring)
- Gonadotropina coriónica humana recombinante (Ovitrelle® Laboratorios Merck)

V.1.1.2 Medios de cultivo:

- ISMI®Medicult. Dinamarca
- Hialuronidasa®Medicult. Dinamarca
- PVP®Medicult. Dinamarca
- Flushing medium®Medicult. Dinamarca
- Dulbecco PBS sin CaCl₂ ni Mg Cl₂ (GIBCO®)
- IVF medium®Medicult. Dinamarca

V.1.1.3 Reactivos para Microscopia Electrónica:

- Glutaraldehído al 3 % (Merck) en Buffer fosfato 0,12 M
- Paraformaldehído al 4% (Electron Microscopy Science)
- Araldita (Fluka)
- Unicryl (BBInternational)
- Acetato de uranilo (Merck)
- Citrato plomo (Sigma)

V.1.1.4 Reactivos para WESTERN BLOT:

V.1.1.4.1 Tampones:

- Tris-HCL 10mM pH 7,4
- Tris-HCL 1M pH 9,2
- Tris-HCL 0,5 M ph 6,8

- PBS (GIBCO®)

V.1.1.4.2 *Soluciones para las muestras:*

- Buffer de lisis:
 - PBS (GIBCO®)
 - Triton X100
 - Protease inhibitor cocktail tablets Complete EDTA free (Roche)
- UREA (8 M) (Sigma)
- Solución de carga (Laemmli sample buffer):
 - Tris-HCl 50 mM pH 6.8
 - SDS 2%
 - Glicerol 10%
 - Azul de bromofenol 0,1%
 - β -Mercaptoetanol 1%
- Reactivo de Bradford:
 - Azul brillante Coomassie 0.117 mM
 - Etanol 5% (v/v)
 - Ácido ortofosfórico 15% (p/v)
 - Agua destilada

V.1.1.4.3 *Gel de poliacrilamida 7,5% y 1,5 mm de grosor:*

- Gel separador o running gel:
 - Acrilamida (30%)
 - Tris-HCL 1M ph 9,2
 - SDS 10X
 - Persulfato amónico (10%)
 - TEMED
 - Agua destilada

V.1.1.4.4 *Tampones de electroforesis, transferencia e incubaciones:*

- Tampón de electroforesis:
 - Tris-HCL
 - Glicina
 - SDS
 - Agua destilada
- Tampón de transferencia:
 - Tris-HCL
 - Glicina

- Agua destilada
- TBST:
 - Tris-HCl 50 mM pH 7.5 + NaCl 0,15 mM, Tween-20 (0,05%)
- Buffer para bloquear uniones inespecíficas:
 - TBTS + leche desnatada en polvo (3 %)
- Buffer de stripeado:
 - Glicina 200mM, pH 2,8
 - EDTA 1 mM
 - SDS 0,1 %

V.1.1.4.5 *Anticuerpos y Reactivo revelador:*

- Anticuerpos primarios policlonales purificados por afinidad siguiendo una modificación del protocolo de Lajoie-Mazenc (Lajoie-Mazenc y cols, 1994).
 - Anti TBCD procedente de conejos inoculados (1:1000)
 - Anti TBCE procedente de conejos inoculados (1:100)
- Anticuerpos primarios comerciales:
 - Anti α -tubulina B512 monoclonal procedente de ratones inoculados (Sigma) (1:4000)
 - Anti β -tubulina policlonal procedente de conejos inoculados (ABCAM) (1:1000)
- Anticuerpos secundarios
 - Anti IgG de conejo unida a un anticuerpo anti peroxidasa *horseradish* (rábano) de asno, (Ge Healthcare)
 - Anti IgG de ratón unida a un anticuerpo anti peroxidasa horseradish de asno (Invitrogen).
- Reactivo revelador, Pierce Ecl Wester Blotting (Termo Scientific)

Las combinaciones de anticuerpos secundarios fueron diseñadas para evitar posibles reacciones cruzadas.

V.1.1.5 **Reactivos para inmunofluorescencia:**

V.1.1.5.1 *Fijadores:*

- Metanol (VWR Chemicals Prolabo)
- Paraformaldehído 4% (Electron Microscopy Science)

V.1.1.5.2 Soluciones permeabilizadoras:

- PBS + Tritón 1%
- PBS + Tritón 5%

V.1.1.5.3 Anticuerpos y fluorocromos:

- Anticuerpos primarios:
 - Anticuerpo antiTBCD 1:5
 - Anticuerpo antiTBCE 1:1
 - Anticuerpo B512 1:1000 (Sigma)
- Anticuerpos secundarios:
 - Anticuerpo frente inmunoglobulinas IgG de conejo (1:1000 /1:800) conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen)
 - Anticuerpo frente inmunoglobulinas IgG1 de ratón (1:1000) (Sigma) conjugado con CY3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)
 - Anticuerpo frente inmunoglobulinas IgG1 de ratón (1:300) (Sigma) conjugado con Alexa 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)
- Hoechst 33258 (Sigma) (1:1000)
- Mitotraker (Molecular Probes ®, Life Technologies)(1:2000)

V.1.1.6 Reactivos para PCR:

- RNA lätter (Ambion)
- Reactivo Trizol® (Invitrogen)
- Tampón de reacción (Sigma)
- Taq polimerasa (Sigma)
- Mezcla deoxinucleótidos trifosfato (Sigma)
- Kit Dynabeads mRNA-Direct Extraction (Ambion)
- Kit RNase-free DNase (Promega)
- Kit ImProm-II reverse transcription system (Promega)
- Tampón Tris/acetato/EDTA (TAE)
 - Trizma 0,4M
 - Ácido acético glacial 5,7% (v/v)
 - EDTA 10mM pH 8
- Gel de agarosa

- Agarosa 2%
- TAE (DEPC) 100ml
- Bromuro de etidio 7 μ l

V.1.1.7 Reactivos para la extracción de ADN:

- Kit Mini NúcleoSpinde®BloodL (Maherey GMBH & Co.KG.)

V.1.2 *Material biológico:*

V.1.2.1 Fragmentos de testículo

Se obtuvieron muestras de tejido testicular de 14 pacientes de la Unidad de Reproducción Asistida diagnosticados de azoospermia, de los cuales 3 se habían sometido a una vasectomía previa en años anteriores.

Las biopsias testiculares fueron llevadas a cabo bajo anestesia local con Mepivacaina al 2 % (Scandicain, al 2%). Se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm en el escroto y se disecaron una a una las capas del testículo hasta llegar a la túnica albugínea de donde se obtuvieron pequeñas piezas de tejido (2-3 mm) que fueron depositadas en una placa *petri* con medio de cultivo taponado con hepes y 37 °C de temperatura (Flushing medium ®Medicult.Dinamarca), (Mínguez y cols, 2005).

De cada paciente se obtuvieron dos fragmentos de tejido testicular. Dos fragmentos fueron destinados a estudios de innumomicroscopía electrónica. Uno de ellos fue por inmersión en una solución fijadora de Paraformaldehído (Electron Microscopy Science) al 4% y el otro fragmento con Glutaraldehído (Merck) al 0,1 %. Ambos fijadores fueron hechos con Buffer fosfato 0,12 M, a pH 7,3.

V.1.2.2 Espermatozoides de eyaculado:

Los espermatozoides de eyaculado se obtuvieron de muestras seminales procedentes de 204 varones, pacientes de la URA entre los años 2008 y 2014.

Las muestras de semen utilizadas fueron capacitadas mediante la técnica del Swim-up directo. Primero, fueron lavadas con *Flushing médium* (®Medicult. Dinamarca) y centrifugadas a 300 g durante 10 minutos. Tras la centrifugación y una

vez retirado el sobrenadante, dependiendo de la cantidad de pellet que se obtuvo se añadió entre 150 y 400 μ l de *IVF médium* (©Medicult. Dinamarca) y se incubaron durante 1 hora a 37°C y 6% CO₂. Por último, tras la hora de incubación se recuperó el sobrenadante.

Una vez obtenidos los capacitados, las muestras fueron divididas en tres grupos. Un grupo, fue congelado a - 80° C para posteriormente realizar con ellas estudios bioquímicos. Otro grupo de muestras fue utilizado para realizar estudios de inmunofluorescencia, y fueron lavadas con PBS 1X (Gibco®) a 300 g durante 20 minutos. El último grupo fue lavado dos veces con PBS 1X (Gibco®) a 300g durante 10 minutos y conservadas en RNA lather a 4 °C para realizar RT-PCRs.

V.1.2.3 Estimulación ovárica, ovocitos humanos:

Para realizar este estudio se recogieron ovocitos inmaduros en diferentes estadios de meiosis (Profase I y Metafases I), los cuales carecen del potencial para ser fecundados por un espermatozoide y ovocitos maduros (Metafases II) que no fecundaron de pacientes que se habían sometido a Técnicas de Fecundación *in vitro*. La aplicación de estas técnicas consiste en, someter a las pacientes a una estimulación ovárica controlada mediante un tratamiento hormonal (Agonista o Antagonista, Fig. M-1) que permita la obtención de un cierto número de óvulos maduros que posteriormente serán fecundados para dar lugar a embriones que serán transferidos al útero de la paciente.

El tratamiento para la estimulación ovárica de las pacientes se realizó con agonistas o antagonistas de la GnRH. Para el tratamiento con agonistas (Fig. M-1A), el protocolo utilizado fue descrito por Navarro y col en 2001. La estimulación ovárica se realizó con la administración de acetato de leuprolide (Procrin ® Laboratorios Abbott. Madrid) a una dosis de 0,5 mg/día desde la fase lútea (día 21) del ciclo previo al de estimulación. Una vez se comprobó la supresión hipofisaria se inició la administración de *FSH* recombinante (Gonal-F ® Lab. Serono. Madrid; Puregon ® Lab. Organon. Barcelona) a una dosis de 300 UI/día durante 5 días, a partir de los cuales esta se ajustó en función de la respuesta individual.

En cambio, en el tratamiento con antagonistas (Fig. M-1B), la estimulación con *FSH* recombinante (Gonal-F ® Lab. Serono. Madrid; Puregon ® Lab. Organon.

Barcelona) se inició el día dos del ciclo con una dosis de 300 UI/día, estudiándose la respuesta individual a partir del día 7 para el ajuste de la dosis. Entre el 5º-7º día del ciclo o a partir de la detección ecográfica de al menos un folículo de 14 mm o mayor se comenzó la administración del antagonista (Orgalutran ® Lab. Organon. Barcelona) a una dosis de 0,25 mg/día hasta el final del tratamiento (Barri, 2005).

En ambos tratamientos, el control del desarrollo folicular se realizó con determinaciones de estradiol sérico y ecografía transvaginal. Cuando se observó una adecuada madurez folicular, es decir, presencia de al menos 4 folículos mayores de 16 mm y unos niveles adecuados de estradiol para dicho desarrollo folicular, se inició la administración de 10.000 UI de Gonadotropina coriónica humana recombinante (Ovitrelle ® Lab. Serono. Madrid) (Barri, 2005).

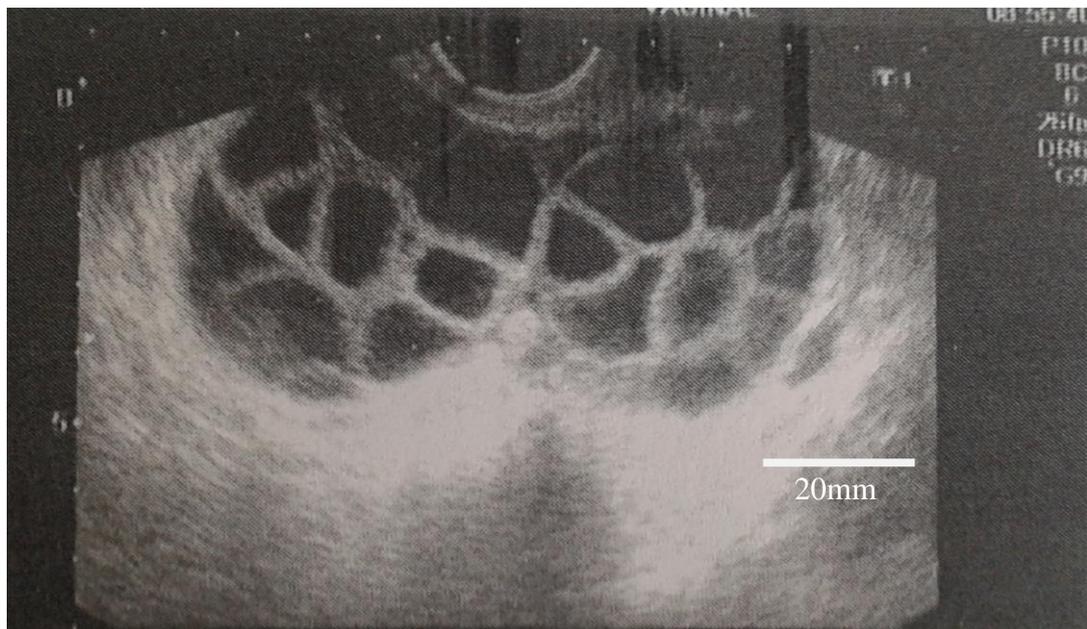


Fig.M-1: Imagen de una ecografía vaginal de unos ovarios estimulados con gonadotropinas. En cada ovario se observan los folículos maduros (entre 16 y 18 mm de tamaño) en cuyo interior hay un ovocito.

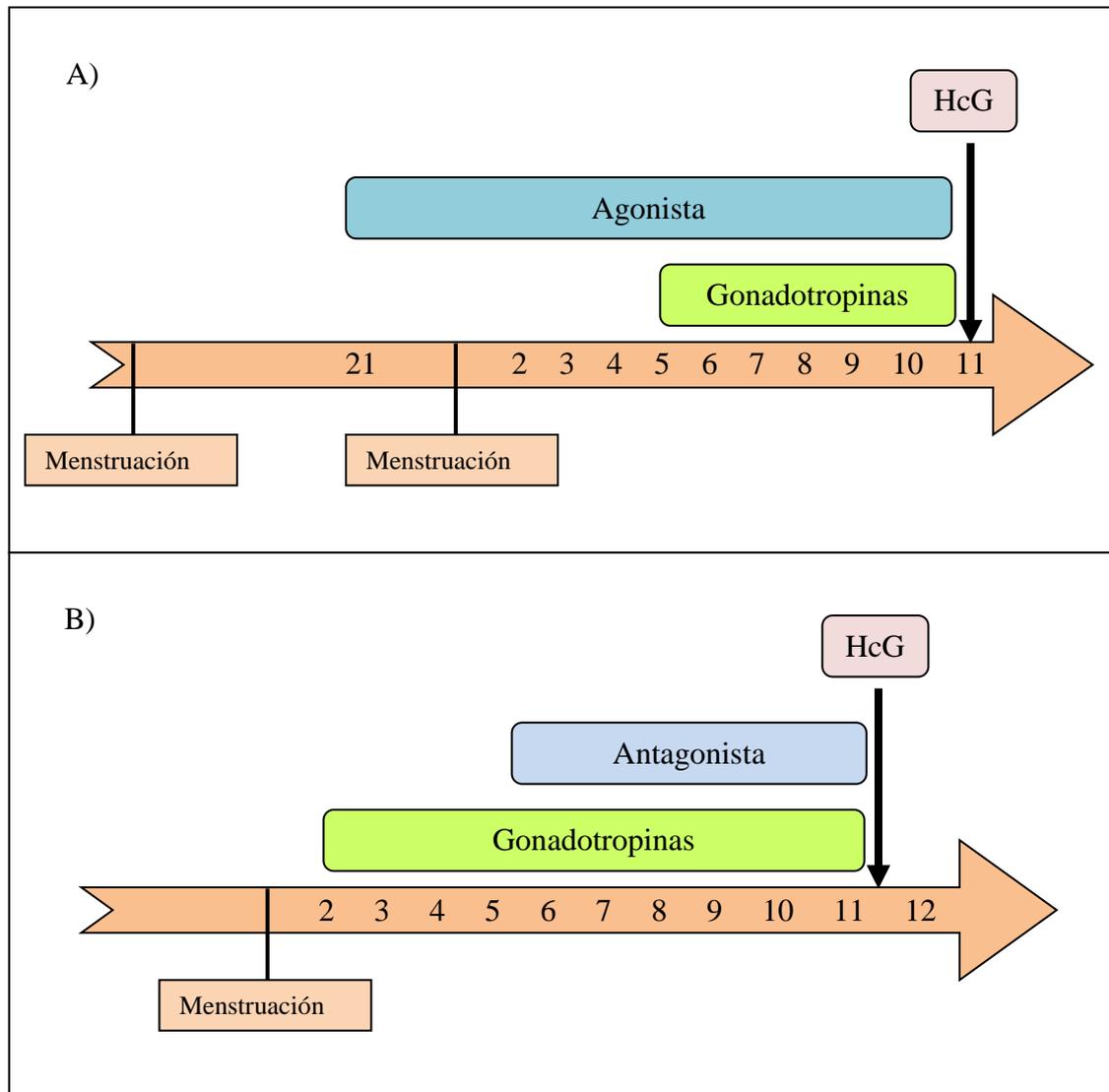
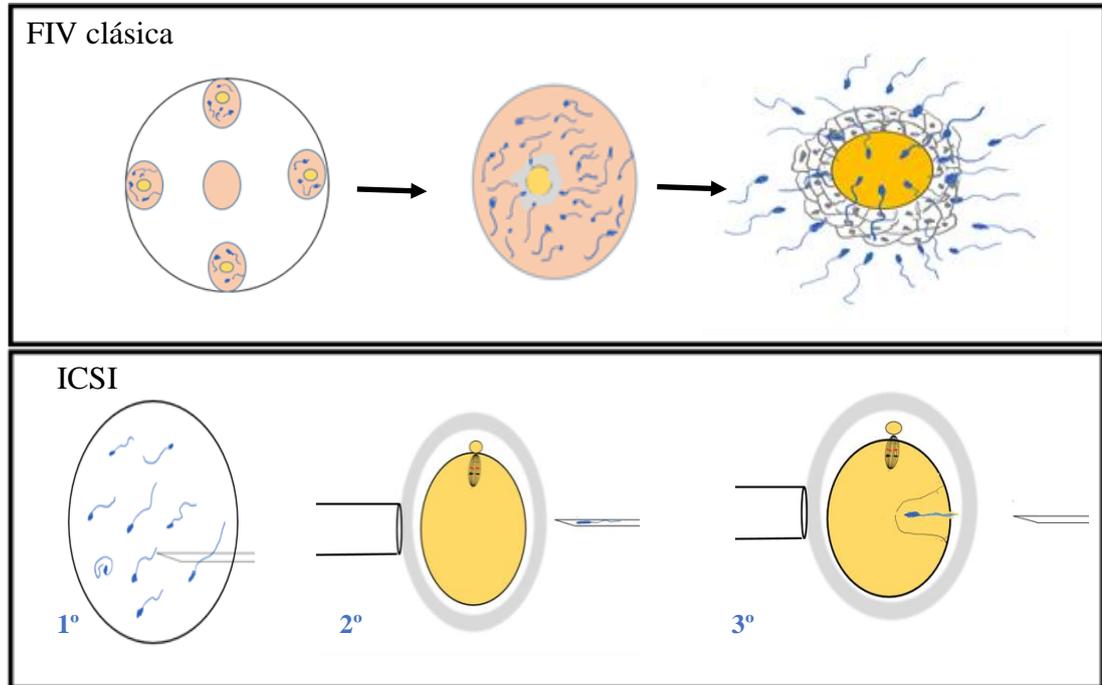


Fig.M-2: Esquema de los Protocolos de Estimulación Ovárica (Barri, 2005)

Los ovocitos fueron obtenidos mediante punción folicular ecoguiada e incubados un mínimo de 3 horas en medio de cultivo (IVF medium[®] Medicult. Dinamarca) a 37°C y 6% CO₂. Al cabo de las 3 horas de incubación, en aquellos casos en los que se realizó microinyección intracitoplasmática (ICSI), los ovocitos se desnudaron con la ayuda de la enzima hialuronidasa (®Medicult. Dinamarca) y con pipetas de decumulación. Sólo los ovocitos que estuvieron en el estadio de Metafase II (MII) fueron microinyectados (Fig. M-3A). Los ovocitos inmaduros fueron recogidos para el estudio. Cuando se utilizó la técnica de fecundación *in vitro* clásica (FIV), todos los ovocitos obtenidos en la punción junto con las células del cúmulo fueron inseminados con 50.000 espermatozoides/ml y no se pudo valorar el estadio madurativo de los mismos hasta el momento de determinar la fecundación (Fig. M-3A).

A las 18h post inseminación o post microinyección se comprobó la fecundación mediante la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares en cada ovocito (cigoto) (Fig. M-3B). Los ovocitos inmaduros procedentes de la técnica de FIV y los ovocitos no fecundados obtenidos con ambas técnicas fueron recogidos para el estudio.

A- Día Punción, D+0



B- D+1, Comprobación fecundación

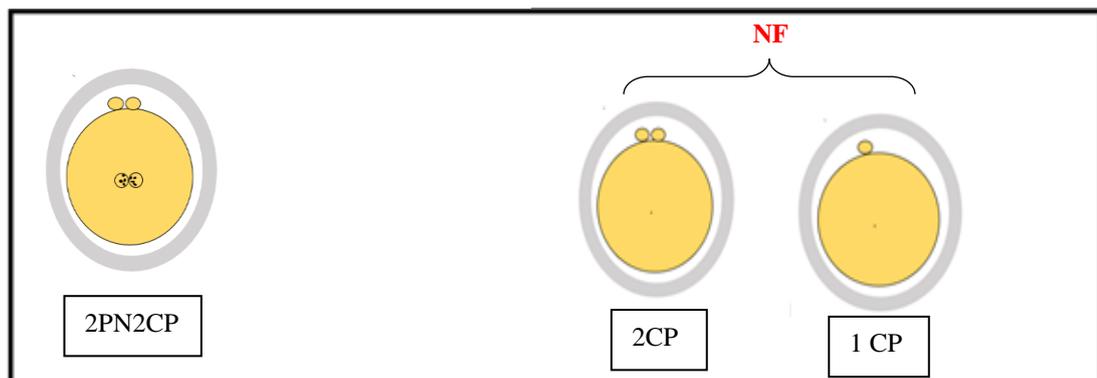


Fig.M-3: Esquema resumen de las Técnicas de Fecundación in vitro (TRA). A. Día de la punción (D+0): día en el que se extraen los ovocitos mediante punción folicular y se realizan las TRA. FIV: fecundación in vitro clásica, los ovocitos se incuban con los espermatozoides capacitados en una gota de medio de cultivo. ICSI: microinyección intracitoplasmática. Con la micropipeta de microinyección, se selecciona un espermatozoide que cumpla criterios en cuanto a movilidad y morfología (1º). Con la micropipeta de contención o holding, se sujeta el ovocito con el CP en la posición de las 6 o 12 horas (2º) para no dañar el huso meiótico en el momento de la microinyección (3º) del espermatozoide dentro del ovocito. B. El D+1, es el día que se comprueba entre las 17-20 horas post FIV o ICSI la fecundación normal mediante la presencia de 2 pronúcleos y dos CPs (2PN2CP). Los ovocitos donde no se observan pronúcleos y solo se detecta 1 o 2 CP son considerados ovocitos no fecundados.

Los ovocitos recogidos fueron divididos en tres grupos. Los ovocitos destinados a las pruebas bioquímicas fueron lavados en PBS 1X (Gibco®). Parte de estas células, fueron conservadas en buffer de lisis a -80°C y la otra parte en RNA lather (Ambion) a 4°C. El tercer grupo de ovocitos fue fijado con paraformaldehído (Electron Microscopy Science) al 4%.

V.1.2.4 Muestras sanguíneas:

Los estudios de polimorfismo fueron llevados a cabo en 408 pacientes, 204 varones y 204 mujeres en tratamiento de fecundación *in vitro* en la URA. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas el día de la punción folicular o biopsia testicular.

Como casos controles, se utilizaron 250 muestras procedentes del banco de sangre. Tanto los controles como los pacientes de la URA formaron parte de un estudio mayor que también incluyó 250 muestras de pacientes con esquizofrenia obtenidas en el Servicio de Psiquiatría de nuestro hospital.

La extracción de sangre de vena periférica fue llevada a cabo mediante punción en la fosa antecubital, en un tubo de 4 ml con EDTA (Vacuette®). Una vez extraída la sangre, los tubos fueron inmediatamente congelados a -4°C hasta el día de la extracción del ADN de dichas muestras.

V.2 Métodos:

V.2.1 Western blot

Para poder realizar los *western blot*, una vez descongelados los ovocitos que habían sido conservados en buffer de lisis a -80°C, fueron sonicados y posteriormente centrifugados a 5000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga de mesa.

En el caso de los espermatozoides, una vez descongeladas las muestras (-80°C) fueron lavadas en PBS 1X (5000 rpm durante 10 minutos). A continuación se añadió al pellet 200 µml de una solución de Tris 50mM pH 8 más inhibidores de proteasas (Roche) y se incubaron en hielo. Para producir la lisis de los espermatozoides, la muestra fue pasada 3 veces por una aguja de insulina. El material resultante fue centrifugado 4500 rpm durante 40 minutos a 4°C y se recogió por un lado el

sobrenadante y por otro el pellet. Los pellet fueron tratados con UREA (8 M) (Sigma) a temperatura ambiente durante 30-40 minutos. Seguidamente fueron sonicados.

Como células control fueron utilizadas células renales de embrión humano (Hek293T, del término inglés "*Human Embryonic Kidney 293 cell*") procesadas de la misma manera que los gametos. La determinación de la concentración de proteína en los sobrenadantes de los espermatozoides y de los ovocitos para obtener una concentración final de 50 µg totales de proteína se realizó por el método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Se prepara una recta patrón con seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma), entre 0 y 20 µg, disuelta en el mismo tampón en el que se encuentra la proteína problema. Cada tubo con patrón o muestra se completa hasta 800 µl con agua y se le añaden 200 µl del reactivo "Bio-Rad Protein Assay" (BioRad). Se agitan los tubos y se espera 15 minutos antes de medir la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro DU640 Spectrophotometer (Beckman).

Una vez determinada la concentración de proteína en los sobrenadantes de espermatozoides, ovocitos y células Hek293T se les añadió el tampón de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6.8 + SDS 2% + Glicerol 10% + Azul de bromofenol 0,1% + β-Mercaptoetanol 1% + agua destilada) y fueron incubados a 100°C durante 5 minutos.

Se utilizaron geles SDS-PAGE (Laemmli, 1970) de 7,5% (Nacional Diagnostics) en un tampón Tris-glicina compuesto por Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM y SDS 0,1% para poder separar en condiciones desnaturizantes las proteínas presentes en base a su peso molecular. Como control positivo, se utilizaron células humanas Hek 293T procesadas de igual manera que los espermatozoides y los ovocitos. La electroforesis se realizó a 200V y una vez terminada, los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD) a 360mA. Tras la electrotransferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau (Sigma) al 0,2% en una solución de TCA al 3%. El exceso de colorante se eliminó enjuagando las membranas con agua Helix. Antes de llevar a cabo el bloqueo de las membranas, estas fueron lavadas repetidas veces con TBST. A continuación se trataron con la solución de bloqueo (TBST con leche desnatada en polvo al 3%, TBST milk al 3%) para evitar uniones inespecíficas durante al menos una hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios y secundarios fueron diluidos en TBST milk al 3%. Después de bloquear las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido toda la noche (overnight) a 4°C. Al finalizar el periodo de incubación, se lavaron varias veces con TBST y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario comercial (1:4000). Seguidamente la membrana fue lavada con TBST 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fue incubada con el reactivo revelador Pierce Ecl Wester Blotting (Thermo Scientific) que contiene peroxidasa y permite detectar la proteína unida al anticuerpo primario por quimioluminiscencia exponiendo las membranas con “CL-XPosureFilm” (Termo Scientific®) entre 10 segundos y varios minutos.

Se emplearon anticuerpos primarios policlonales producidos en nuestro laboratorio: anti-TBCD (1:1000) y anti-TBCE (1:100) y anticuerpos primarios comerciales: anti- β -tubulina de conejo (ABCAM) (1:1000) y anti- α -tubulina de ratón (Sigma) (1:4000). El anticuerpo secundario de conejo (Ge Healthcare) se utilizó a la dilución 1:4000 y el de ratón a la dilución 1:2000.

En algunas ocasiones, las membranas de nitrocelulosa fueron reutilizadas y para ello fue necesario en primer lugar lavar bien las membranas con TBST durante 30 minutos y aclarar con agua hélix. Se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con buffer Glicina 0,2 M pH 2,8, EGTA 1 mM y SDS 0,1%. A continuación se volvieron a aclarar bien con agua hélix y se lavaron de nuevo con TBST. A partir de ese momento, se volvieron a bloquear de nuevo con TBST milk al 3% para posteriormente ser incubadas de nuevo con anticuerpos primarios.

V.2.2 RT-PCR

Para la extracción de ARN de los ovocitos en cada uno de los estadios madurativos estudiados (20 ovocitos por estadio y por triplicado) y de los espermatozoides (1×10^6 spz) se utilizó el kit de aislamiento Dynabeads mRNA-Direct Extraction Kit (Ambion) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante después de recuperar y lavar estas células del ARN-later (Ambion). Seguidamente, para evitar contaminaciones con el ADN genómico, los ARN obtenidos fueron tratados con el kit RNase-free DNase (Promega).

Como tejido control se utilizó el córtex cerebral humano. El tejido fue previamente lisado y homogeneizado con 1ml de TRIZOL® (Invitrogen) y posteriormente incubadas a temperatura ambiente durante 2-3 min en 0,2 ml de cloroformo. A continuación, la mezcla fue centrifugada a 10.000g durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante incoloro y se incubo con isopropanol (1:1) durante 10 minutos a temperatura ambiente para ser seguidamente centrifugado a 10.000 g durante otros 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el pellet fue lavado a 10.000g durante 5 minutos a 4°C con etanol al 70%. Al terminar la centrifugación, el etanol fue retirado y se dejó secar la muestra que posteriormente fue homogeneizada en agua mili-Q a 65°C. Al igual que con los ARN procedentes de los ovocitos y los espermatozoides, estos ARN fueron tratados con tratados con el kit RNase-free DNase (Promega).

Por último, antes de iniciar la síntesis de los ADNc, la pureza de las muestras obtenidas de los tres tipos celulares, fueron calculadas espectroscópicamente (260-280 nm) utilizando un Nano Drop®ND-1000 (Thermo Scientific).

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit ImProm-II reverse transcription system (Promega) y 1 µg de ARN al que se le añadieron 2 µl de hexámeros aleatorios y 9 µl de agua mili-Q y se incubo a 65°C durante 10 minutos. A continuación, se añadió la mezcla de reacción (4µl de tampón de síntesis de ADNc (5X), 1,5 µl de MgCl₂, 1 µl de mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (10mM), 0,5 µl del inhibidor de ARNasa (40U/µl) y 1 µl de la transcriptasa inversa (Promega)). Tras un pulso de centrifugación, la mezcla fue introducida en el termociclador (MyCycler™, Bio-Rad Laboratories). Los ciclos necesarios para la síntesis fueron los especificados en la tabla M-1. Las copias de ADNc obtenidas fueron almacenadas en alícuotas a -20°C hasta que fueron utilizadas.

Tabla M-1: Ciclos necesarios para la síntesis de ADNc

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Número de ciclos
10	25	1
60	55	1
5	85	1
-	4	

Los ADNc obtenidos fueron amplificados por PCR. Para ello, se utilizó 1 µl de ADNc que fue mezclado con 5 µl de tampón de reacción 10x (Sigma), 0,5 µl de la enzima Taq polimerasa (Sigma), 5 µl de MgCl₂ (Sigma), 1 µl de mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (10 mM) (Sigma), 2,5 µl (20 µM) de los *primers*

representados en la tabla M-2 y agua mili-Q hasta 50 μ l. Los *primers* para TBCD y TBCE se diseñaron con el programa Primer-BLAST.

Para determinar la presencia del ADNc amplificado se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 100 V. A cada 50 μ l de muestra se les añadió 12.5 μ l de tampón de carga.

Tabla M-2: *Primers utilizados para realizar las RT-PCRs. Diseñados con el programa Primer-BLAST. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).*

Gen	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)	T° de hibridación
Cofactores de la tubulina			
hTBCA	(F) CCTCGCGTGAGACAGATCAA (R) TCTTGTAGGATCTCTGCCTGC	167 pb	58 °C
hTBCB	(F) CGGTGACCGTTTTTCATCAGC (R) GTCTTGCCCTGGTTCGTAGG	329 pb	59 °C
hTBCC	(F) CCAACCTGGAGTCCCAAGTC (R) TCGTACTGTGTATGCGGAGC	240 pb	58 °C
hTBCD	(F) GGACGAGGTGGTACTGTG (R) GCTCAGAGACAAAAGGCAGGA	400 pb	70 °C
hTBCE	(F) AGCCCATCCCAGATACCAGT (R) ATTTCCGGTGAACCCAGAC	406 pb	61 °C
Tubulina			
β -tubulina	(F) CTCTCAGAACCTTCCTGCCG (R) CAGGATGGCACGAGGAACAT	350 pb	58 °C
Control positivo			
ACTB (β -actina)	(F) TCCCTGGAGAAGAGCTACGA (R) ATCTGCTGGAAGGTGGACAG	362 pb	58 °C

Proceso	Tiempo	Temperatura °C	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	2'	95	1
Desnaturalización	30''	95	40
Hibridación	30''	(58-70)	
Síntesis de la cadena	1'	72	
Ultima prolongación	5'	72	1
Mantenimiento	-	4	∞

V.2.3 Microscopía Electrónica

Los fragmentos de tejido testicular obtenidos mediante biopsia testicular fueron fijados por inmersión en una solución que contenía Glutaraldehído (Merk) al 3 % en Buffer fosfato 0,12 M y deshidratadas en acetonas de concentración creciente e incluidas en Araldita (Fluka). Secciones ultrafinas, de 70 nm de espesor, fueron obtenidas en un Ultramicrotomo LKB de 70 nm de espesor y recogidas en rejillas de níquel para ser posteriormente teñidas con acetato de uranilo (Merk) y citrato de plomo (Sigma) y observadas en un microscopio Philips EM-208.

V.2.4 Inmunomicroscopía Electrónica

Para realizar los estudios de inmunomicroscopía electrónica, las piezas de tejido obtenidas mediante biopsias testiculares y fijadas en Paraformaldehído al 4% y Glutaraldehído al 0,1 %, fueron deshidratadas en alcoholes de concentración creciente, incluidos en Unicryl (BBInternational, Cardiff, UK) y polimerizados a 4°C bajo una lámpara de luz UV durante 48-72 horas. Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos, de 80 nm de espesor, con un ultramicrotomo LKB y fueron recogidas en rejillas de níquel e incubadas toda la noche a temperatura ambiente con anti-TBCD (1:5) o TBCE como anticuerpo primario. Al finalizar el periodo de incubación fueron lavados abundantemente con Buffer fosfato 0,12 M para eliminar los restos de anticuerpo primario y posteriormente incubarlos en 1:100 *antirabbit* IgG conjugado con oro coloidal, 10 nm (Sigma, St. Louis, MO) durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones fueron observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico Phillips EM-208.

V.2.5 Inmunofluorescencia

En el caso de los ovocitos para favorecer la penetración del fijador en la célula, se realizó un pequeño orificio en la zona pelúcida (ZP) mediante la técnica de eclosión mecánica utilizando un microscopio invertido (Eclipse200, Nikon) con un sistema de micromanipulación incorporado (Narisigue). Esta técnica consiste en realizar un pequeño agujero por fricción en la cubierta del ovocito. Cada ovocito fue depositado en una gota de 10 µl de Flusing Medium (®Medicult.Dinamarca) y posteriormente fue sujetado con la ayuda de una micropipeta de sujeción (holding, Humagen), mientras que con una micropipeta de eclosión (PZD, Humagen) se atravesó el espacio comprendido entre la ZP y el citoplasma hasta que volvió a salirse por otra localización de la ZP. A

continuación, el ovocito fue liberado de la micropipeta de sujeción, quedando el ovocito sujeto a la micropipeta de eclosión, la cual fue frotada contra la micropipeta de holding creándose un pequeño orificio en la ZP (de unos 50 micrómetros) (Fig.M-4).

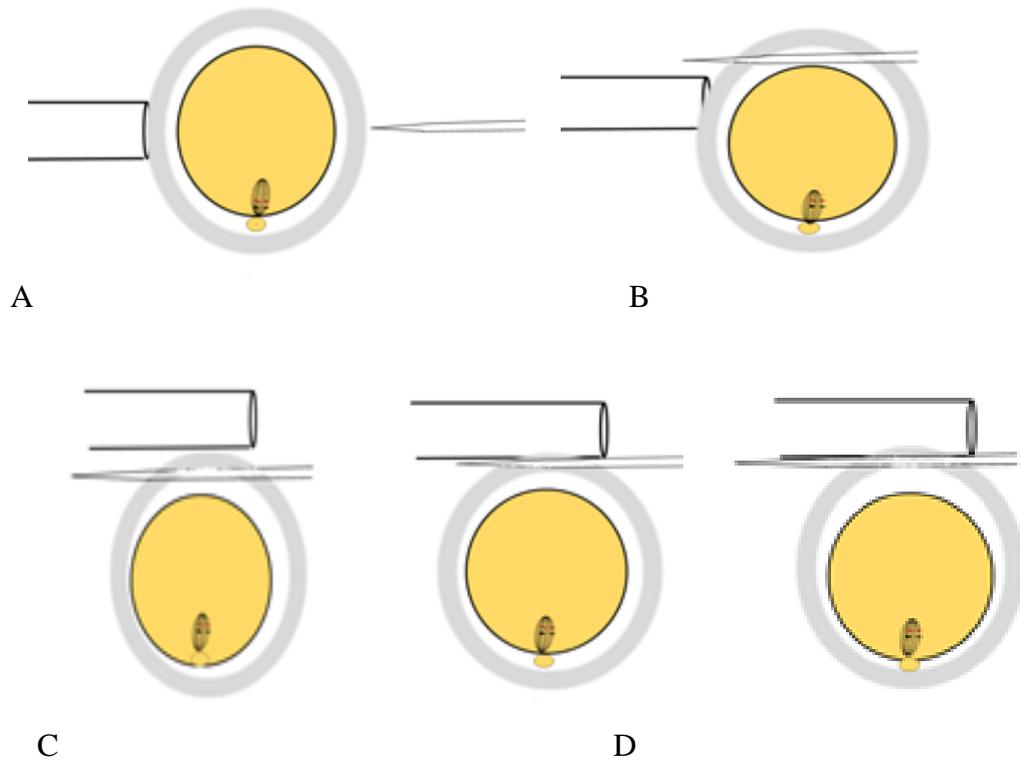


Fig.M-4: Esquema de los 4 pasos necesarios para realizar Hatching Mecánico. A: El ovocito es sujetado con la micropipeta de holding. B: La micropipeta de ZPD atraviesa la ZP. C: El ovocito es liberado de la pipeta de sujeción. D: La micropipeta de eclosión con el ovocito insertado en ella, se frota contra la micropipeta de holding.

A continuación, los ovocitos fueron fijados en paraformaldehído (Electron Microscopy Science) al 4% durante 1 hora a 37°C. Seguidamente con la ayuda del microscopio estereoscópico (SMZ 800, Nikon), los ovocitos fueron colocados, con la menor cantidad de medio posible en cubreobjetos de borosilicato recubiertos de poly-L-lysina, y se dejaron secar sobre una placa calefactada, a 37 °C.

A la hora de valorar las imágenes obtenidas durante este trabajo fue importante tener en cuenta que la mayoría de los MII utilizados fueron expuestos a espermatozoides mediante las técnicas de FIV clásica (Fig.M-5) o ICSI (Fig.M-5) y no fecundaron. Por este motivo, en las fotos de microscopía confocal que se obtuvieron, se observaron en algunos casos espermatozoides unidos a la ZP de los ovocitos, 1 o 2 CPs

o dos genomas diferentes dentro del ovocito, uno correspondiente al ovocito y otro al espermatozoide (Fig.M-6).

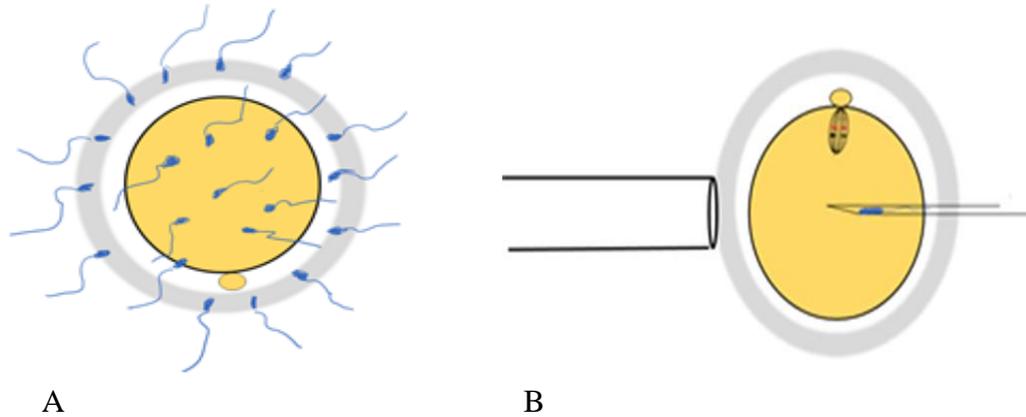


Fig.M-5: Esquema de las TRA. A. Tras realizar una FIV clásica, se observan espermatozoides unidos a la ZP de los ovocitos. B. ICSI: con la ayuda de un sistema de micromanipulación, se introduce dentro de un MII de forma mecánica un espermatozoide al que previamente se ha inmovilizado para que tenga lugar la fecundación.

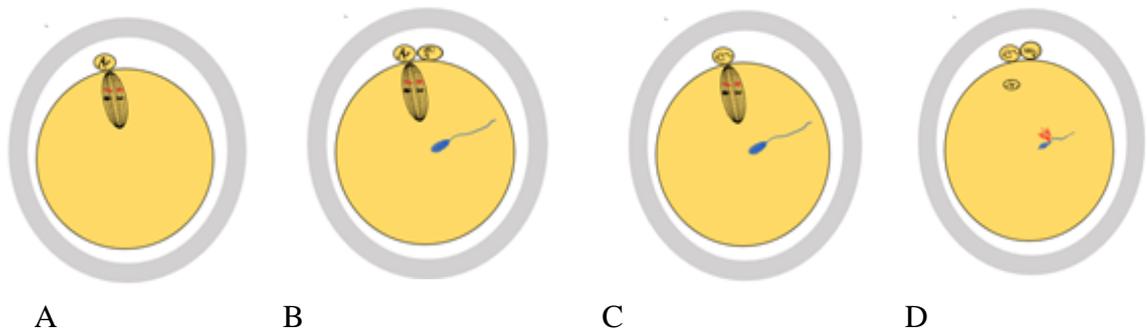


Fig.M-6: Esquema representativo de alguna de las posibilidades de combinaciones que se van o poder observar en los ovocitos en MII al realizar el análisis de las inmunofluorescencia al Microscopio Confocal. A: MII no fecundado con 1 CP. B. MII con un espermatozoide en el citoplasma que ha reanudado la 2ª división meiótica y ha expulsado el 2CP. C. MII con un espermatozoide en su interior que no ha avanzado en el proceso de meiosis. D. MII con un espermatozoide en el citoplasma que ha continuado con la meiosis y extruido el CP y se inicia la formación de un haz de MT a partir del centríolo proximal del espermatozoide.

Los espermatozoides fueron fijados con metanol a -20°C durante 10 minutos o fijados en paraformaldehído (Electron Microscopy Science) al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente plaqueados en cubreobjetos con poly-L-lysina.

Se realizaron inmunofluorescencia doble con anti TBCD o anti TBCE y anti- α tubulina y se utilizó Hoestch para visualizar el ADN. Tanto los ovocitos como los espermatozoides fueron permeabilizados con PBS-T 5 % (@Gibco) a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se añadieron, los anticuerpos primarios de conejo, o bien TBCD (1:5) o TBCE (1:1) y el anticuerpo monoclonal de ratón anti- α tubulina B512 (1:500 en espermatozoides y 1:1000 en ovocitos) (Sigma) y se incubaron o bien *overnight* a 4 °C o 45-60 minutos a temperatura ambiente. Terminado el periodo de incubación, se retiraron los anticuerpos primarios y se realizaron lavados con PBS-0,1% Tritón (@Gibco). Por último se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos secundarios y con el reactivo Hoechst 33258 (1:1000) (Sigma). Se utilizó un anticuerpo secundario anti- conejo conjugado con Alexa 488 (1:800) (Molecular Probes, Invitrogen), y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (1:1000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) anti ratón. Las imágenes fueron tomadas por un lado mediante Microscopia Confocal con un equipo Nikon A1R y por otro lado con microscopia DIC con un equipo ZEISS LSM 510.

En algunos de estos experimentos, para poder visualizar las mitocondrias se utilizó el reactivo Mitotraker (1:2000) (Molecular Probes, Life Technologies). Previamente a la fijación de los ovocitos y los espermatozoides, estos fueron incubados durante 30 minutos a 37°C y 6% de CO₂. Seguidamente se continuó con el protocolo descrito anteriormente con la única diferencia de que en este caso se utilizó un anticuerpo secundario de ratón conjugado con Alexa 647 en vez de Cy3 ya que este último fluorocromo emite señal en el mismo color que el Mitotraker.

V.2.6 Estudios de SNPs en sangres de pacientes de la URA

La extracción del ADN de las muestras sanguíneas, se llevó a cabo utilizando el kit Mini NúcleoSpinde®BloodL (Maherey GMBH & Co.KG.) y siguiendo el protocolo modificado descrito por la casa comercial. De cada paciente, se utilizaron 200 μ l de sangre a los que se añadieron 25 μ l de Proteína K y buffer BQ1. Se utilizó un vortex para obtener una mezcla homogénea y seguidamente fueron incubados a 70°C durante 10 minutos. A continuación se añadió a la mezcla 210 μ l de etanol, y se cargó en una columna de NúcleoSpinde®BloodL ubicada en un tubo de 1,5 ml. La columna con la mezcla fue centrifugada a 11000g durante 1 minuto y se desechó el líquido que cayó de

la columna. Seguidamente se realizaron dos lavados, en la primero, se lavó la columna con 500µl de buffer BW y en el segundo, con 600 µl de buffer B5. En ambos pasos, las centrifugaciones se hicieron a 11000g durante 1 minuto y se desechó el líquido que cayó de la columna.

A continuación se trasvasó la minicolumna a un eppendorf estéril y se añadió 100 µl del buffer BE y se centrifugó a 11000g durante 1 minuto. En este último paso se conservó la fracción de líquido obtenido de la columna con el ADN purificado y fue alicuotado en fracciones de 20 µl con una concentración de 1µgr/µl de ADN en agua destilada en placas de 96 pocillos y culo plano. Dichas placas fueron conservadas y enviadas a CeGen Barcelona a -70°C hasta el día de su utilización para realizar los SNPs (del término inglés “single nucleotide polymorphisms”).

El estudio de polimorfismo de los TBCs se realizó mediante la técnica de microarrays utilizando un Chip de ADN elaborado por el Centro Nacional de Genotipado (CeGen) siguiendo el diseño realizado por la Dra. López Fanarraga y el Dr. Carlos Valiente Barrosp de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. El Chip de ADN contenía 33 *coding* SNPs localizados en los exones de los genes de los TBCs y causantes de cambios no conservativos. También se añadieron al Chip 24 tagSNIPs para poder realizar estudios de haplotipos.

Para la selección de los 33 coding SNPs se utilizó la lista de SNPs codificantes de los genes de los TBCs propuesta por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica Norteamericana (CNBI) y se llevó a cabo una primera selección en base a las variaciones de nucleótido no-sinónimas que originan cambios en el codón correspondiente que se traducen en una modificación final del aminoácido. Estos cambios podrían afectar a las cadenas laterales de los aminoácidos dando lugar a modificaciones en parámetros tales como volumen, carga y polaridad, los cuales influyen en el plegamiento de la proteína y por lo tanto en su capacidad de realizar sus funciones. Por estos motivos, el siguiente paso fue evaluar la relevancia que pudieran implicar estos cambios en la capacidad funcional de las proteínas resultantes mediante el estudio comparativo entre las propiedades de la cadena lateral del aminoácido resultante respecto al que encontraríamos en el supuesto de no haberse producido la variación.

Finalmente para poder determinar la trascendencia de estas variaciones en las proteínas, se realizó un estudio filogenético que consistía en realizar una comparativa, de las secuencias de alineamiento aminoacídicas entre diferentes especies utilizando como herramienta HomoloGene. El grado de conservación de las cadenas polipeptídicas de las proteínas a lo largo de la evolución es directamente proporcional al grado de importancia tanto estructural como funcional de los correspondientes aminoácidos y por lo tanto variaciones en estos puntos de conservación a lo largo de la evolución nos aportarán claves sobre cambios de aminoácidos que podrán estar causados por mutaciones patológicas y su relevancia en fenotipos patológicos (Tabla M-3).

Tabla M-3: Comparación filogenética de los TBCs en diferentes especies utilizando como herramienta HomoloGene (tesis Valiente, 2009; Valiente, 2013).

Arl2

<i>H. sapiens</i>	1	MGLLTILKKMKQKERELRLLML----GLDNAGKTTILKKFNGEDIDTISP	46
<i>M. musculus</i>	1	MGLLTILKKMKQKERELRLLML----GLDNAGKTTILKKFNGEDVDTISP	46
<i>D. rerio</i>	1	MGLLTILKKMKHKEREMRLLML----GLDNAGKTTILKKFNGEDVSTISP	46
<i>D. melanogaster</i>	1	MGFLTVLKKMRQKEREMRI LLL----GLDNAGKTTILKRFNGEPIDTISP	46
<i>C. elegans</i>	1	MGFLKILRKQRAREREMRI LIL----GLDNAGKTTLMKKFLDEPTDTIE	46
<i>S. pombe</i>	1	MGLLTILRQQKLEREVRVLLL----GLDNAGKTTILKCLLNEDVNEVS	46
<i>H. sapiens</i>	47	TLGFNIKTLEHRGFKLNIDVGGQKSLRSYWRNYFESTDGLI WVVD SADR	96
<i>M. musculus</i>	47	TLGFNIKTLEHRGFKLNIDVGGQKSLRSYWRNYFESTDGLI WVVD SADR	96
<i>D. rerio</i>	47	TLGFNIKTLEHRGFKLNIDVGGQKPLRSYWRNYFESTDGLV WVVD SADR	96
<i>D. melanogaste</i>	47	TLGFNIKTLEHNGYTLNMWDVGGQKSLRSYWRNYFESTDGLV WVVD SADR	96
<i>C. elegans</i>	47	TLGFDIKTVHFKDFQLNLWDVGGQKSLRSYWKNYFESTDALI WVVD SDR	96
<i>S. pombe</i>	47	TFGFQIRTLVEGLRFTIWDIGGQKTLRNFWKNYFESTEAI WVVD SLDD	96
<i>H. sapiens</i>	97	QRMQDCQRELQSL LVEERLAGATLLIFANKQDLP GALSSNAIREVLELDS	146
<i>M. musculus</i>	97	QRMQDCQRELQSL LVEERLAGATLLIFANKQDLP GALSCNAIQEAELELDS	146
<i>D. rerio</i>	97	LRLDDCRKELNALLEERLAGATLLVFANKQDLP GALSKDGIREV LALDD	146
<i>D. melanogaster</i>	97	MRLESCGQELQVLLQEERLAGATLLVLCNKQDLP GALSSNEIKEI LHLED	146
<i>C. elegans</i>	97	ERLLQCSEELKLLGEERLAGASLLVLANKSDLPGAIDVNSIAQVLD LHS	146
<i>S. pombe</i>	97	LRLEECRNTLQELLVEEKL LFTSILVLANKSDVSGALSSSEEISKILNISK	146
<i>H. sapiens</i>	147	I-RSHHWCIQGCSAVTGENLLPGIDWLLDDISS-RIFTAD-	184
<i>M. musculus</i>	147	I-RSHHWRIQGCSAVTGEDLLPGIDWLLDDISS-RVFTAD-	184
<i>D. rerio</i>	147	I-KTHHWCIQCSAVTGENLLSGVDWLLDDIAA-RIFTTD-	184
<i>D. melanogaster</i>	147	I-TTHHWLVAGVSAVTGKLLSSMDWLIADIAK-RIFTLD-	184
<i>C. elegans</i>	147	I-KSHHWKIFSCCALSGDRLVQAMTWLCCDDVGS-RLFILD-	184
<i>S. pombe</i>	147	Y-KSHHWRIFSVSALTGLNIKDAISWLANDLKEIKLGTIDY	184

TBCA

<i>H. sapiens</i>	1	MADPRVRQIKIKTGVV KRLVKEKVMYEKEAKQQE EKIEMRAEDGENYDI	50
<i>M. musculus</i>	1	MADPRVRQIKIKTGVV RRLVKERVMYEKEAKQQE EKIEMKAEEDGENYAI	50
<i>G. gallus</i>	1	MADPRLRQIKIKTGVV KRLAKEKVMYEKEAKQQE EKIEMKAEACDDYGI	50
<i>D. rerio</i>	1	MADPRIRQIKIKTGVV KRLAKEEVLYI KEAKQQE EKIERLKA EAGDEYLI	50
<i>D. melanogaster</i>	1	MTDPRIRQLVIKSGVVRRLTREKYCYAKEVLT EQARLEKLRGDGADHVL	50
<i>H. sapiens</i>	51	KKQAEILQESRMMI PDCQRRLEAAYLDLQRI LENEKDL EEAEEYKEARLV	100
<i>M. musculus</i>	51	KKQAEILQESRMMI PDCQRRLEAAYTDLQQL EISEKDL EEAEEYKEARVV	100
<i>G. gallus</i>	51	KKQAEILQESRMMI PDCQRRLEIAHADLTQL LENEKELEEAEEYKEARSI	100
<i>D. rerio</i>	51	KKQAEVLEQESRMMI PDCHRRLAMAHADLQQL L ETEELAEAEYKEARTV	100
<i>D. melanogaster</i>	51	RKQAEVLEQECIMMVPDSKRRLQKEYEVLEKYL ADEQDLIETDSYKKA AEI	100
<i>H. sapiens</i>	101	LDSVKLEA--	108
<i>M. musculus</i>	101	LDSVKLEA--	108
<i>G. gallus</i>	101	LESVKLEA--	108

<i>D. rerio</i>	101	LDSVKLEG--	108
<i>D. melanogaster</i>	101	LKDAKAELET	110

TBCB

<i>H. sapiens</i>	1	-----MEVTGVSAPTVMVFISSSLN-TFRSEKRY	28
<i>M. musculus</i>	1	-----MEVTGISAPTVMVFISSSLN-SFRSEKRY	28
<i>D. rerio</i>	1	-----MDGSVTIITNPIVSVRVSTVS-SFEVNRRF	30
<i>D. melanogaster</i>	1	-----MSTIIETGKSDFIKVNVSNSHNDVAFAFEVKL	31
<i>C. elegans</i>	1	-----MTEVYDLEITTNAT-DFPMEKKY	22
<i>S. pombe</i>	1	-----MNEITLFIKSSSA--NAERRI	19
<i>S. cerevisiae</i>	1	-----MVRVVESELV---RTEKEL	17

<i>H. sapiens</i>	29	SRSLTIAEFKCKLELVGSPASCMELELYGVDDKFYS----K---LDQED	71
<i>M. musculus</i>	29	SRSLTIAEFKCKLELVGSPASCMELELYGADDFYS----K---LDQED	71
<i>D. rerio</i>	31	NRGITIAEFKSKLELIVGTPASCMDLDFSSSDKFLQ----K---LDNNE	73
<i>D. melanogaster</i>	32	AKDLTVAQLKTKLEILTGGCAGTMKVQVF-KGDTCVS----T---MDNND	73
<i>C. elegans</i>	23	PAGMSLNDLKKKLELVVGTTVDSMRIQLFDGDDQLKG----E---LTDGA	65
<i>S. pombe</i>	20	NPQWTVSQLKTKLVPVIGTPEQYQKLYEPASS-TVPGHVFT---SEEEN	65
<i>S. cerevisiae</i>	18	PNSLKLKQFKDRLYHVTGVEPEDMEIVVKRQYDNKEIYSTKKGAYSNED	67

<i>H. sapiens</i>	72	ALLGSPVDD-----GCRIHVIDHSGARL-----GEYEDVSRVEK-YTIS	110
<i>M. musculus</i>	72	ALLGSPVDD-----GCSIHVIDHSGVRL-----GEYEDVSKVEK-YEIS	110
<i>D. rerio</i>	74	ALLGSPVDD-----DCRIHVTDTRSGTQS-----GEFTDLSKVEK-FEIS	112
<i>D. melanogaster</i>	74	AQLGYANS-----GLRLHVVDVFATFS-----FDSAPVEK-FELS	109
<i>C. elegans</i>	66	KSLKDLGVRD-----GYRIHAVDVTGGNE-----DFKDESMVEK-YEMS	103
<i>S. pombe</i>	66	LDLGEFKLQP-----LGTIVVEDTRPPLL-----RLDFDLSQVVK-YVMP	105
<i>S. cerevisiae</i>	68	EDANFLKGE-----ELIVVVTDSNAQISINQLATQAEGIPSMEV---IS	109

<i>H. sapiens</i>	111	QEAYDQRQDTRVRSFLKRSKLGRYNEEERAQQEAEAAQRLAEKAQASSIP	160
<i>M. musculus</i>	111	PEAYERRQNTVRSFMKRSKLGYPNEELRAQQEAEAAQRLSEKAQASAI S	160
<i>D. rerio</i>	113	DEAYEKRADSI RNFKKNMKGRLGFNEEERAKQEEAVAKKEE EKVAAEAI A	162
<i>D. melanogaster</i>	110	KDQYEQRTDSVRNYLKI NRMGKYNDEEMQAEKRLQAE EI QKRAELCV	159
<i>C. elegans</i>	104	DDTYGKRTDSVRAWKKKMQ---EEQGSAAPMENESDKLNEE--AAKNIM	147
<i>S. pombe</i>	106	REQYENRTDSVYAWKKRNQLGRFNPDFEASKASRQESLKR ELVDL--QKN	153
<i>S. cerevisiae</i>	110	EEDYLRRDQSVLRWKMAHGYGRFNAAQSQRAALAKQDEAYAREQL-TAA	158

<i>H. sapiens</i>	161	VGSRCEVRAAG-----QSPRGTVMYVGLTD-F--KPGYWVGVRYDE	199
<i>M. musculus</i>	161	VGSRCEVRAAP-----HSLRRGTVMYVGLTD-F--KPGYWVGVRYDE	199
<i>D. rerio</i>	163	VGNRCKVQVPG-----QATKIGTVMYVGTAD-F--KPGYWVGVRYDE	201
<i>D. melanogaster</i>	160	LGGRCVTVPG-----NPTRRGTIRYNGPLE-G--KSGHFIVGEYDE	198
<i>C. elegans</i>	148	VGNRCEVTVGA-----QMARRGEVAVYGATK-F--KEGVWVGVRYDE	186
<i>S. pombe</i>	154	LNSRCCA--AG-----E--RYGTIRYIGLVPEINND-NLWVGVEFDE	190
<i>S. cerevisiae</i>	159	IGRHCRTVDG-----SAPREAILRYVGLPL-L-DVMGTWCVGEFPE	198

<i>H. sapiens</i>	200	PLGKNDGSVNGKRYF--ECQAKYG---AFVKPAVTV---GDF-----	234
<i>M. musculus</i>	200	PLGKNDGSVNGKRYF--ECQAKYG---AFVKPSAVTV---GDF-----	234
<i>D. rerio</i>	202	PLGKHDGSVNGKRYF--ECEPKYG---AFVKPLTVTV---GDF-----	236
<i>D. melanogaster</i>	199	PLGKNNGSPGGKAYF--TCAPNYG---GFVSPLSVTV---GDF-----	233
<i>C. elegans</i>	187	PVGKNDGSVAGVRYF--DCDPKYG---GFVRPVDVKV---GDF-----	221
<i>S. pombe</i>	191	PVGKNDGTVSGKRYF--NAKNKHG---SFLRSSEVEV---GDF-----	225
<i>S. cerevisiae</i>	199	AAGKNDGRINGVTLFG-PVAPGHG---SFVRPRAVEILSKDEESAIVED	243

<i>H. sapiens</i>	235	PEEDYGL-DEI-----	244
<i>M. musculus</i>	235	PEEDYGL-DEM-----	244
<i>D. rerio</i>	237	PEEDYGL-DEM-----	246
<i>D. melanogaster</i>	234	PPEDFNMDDEL-----	244
<i>C. elegans</i>	222	PELSI---DEI-----	229
<i>S. pombe</i>	226	PPEDIL--EGL-----	234
<i>S. cerevisiae</i>	244	VHDDVESDDEI-----	254

TBCC

<i>H. sapiens</i>	1	-----MESVSCS-----A	8
<i>M. Musculus</i>	1	-----MEGVDCS-----	7
<i>G. gallus</i>	1	-----MEATGEE-----RRAPAA	13
<i>D. rerio</i>	1	-----MAALGVE-----	7
<i>D. melanogaster</i>	1	-----MEGDAEN-----	7

<i>H. sapiens</i>	9	AAVRTGDMESQRDLSLVPERLQRREQRQLEVERRKQKRQNQEVEKENSH	58
-------------------	---	---	----

<i>M. musculus</i>	8	MALADAAAGSPRDLVSLVPERLQRREQERQIEVERRKQKRQDQEVVEEEKSG	57
<i>G. gallus</i>	14	FVAALGPETGGTAAALPERLQRREAERQGVARQRELKEAQAVREEGSE	63
<i>D. rerio</i>	8	-MNVAQDDGETNTAVKVPESVLRDRQARLEEAERRRDKVQSQTVTEKSD	56
<i>D. melanogaster</i>	8	-----RKDQILERLNKRNRKDRQNYLDVKSELRSKETVQNEGVD	45
<i>H. sapiens</i>	59	-----FFVATFARERAA-----VEELL----ERAES----VERLEEA	87
<i>M. musculus</i>	58	-----FFAAAFARERAA-----VEELL----RGEAS----AERLEEA	86
<i>G. gallus</i>	64	-----FFAAAFGREREA-----VEALL----AAG-----RPEEA	88
<i>D. rerio</i>	57	-----FFTSTFNAEKTQ-----LEEMISSCNDREKA----AKTLEEA	89
<i>D. melanogaster</i>	46	-----YFYQTFSQKTM-----IEQRLKDVQCGDQPTDLARNFADI	82
<i>H. sapiens</i>	88	ASRLQGLQKLINDSVFLAAYDLRQGEALARLQAALAERRRGLQPKKRF	137
<i>M. musculus</i>	87	ANRLQGLRKLINDSVFLAAYDLRQQAALQAVLTERRQELQPKKRF	136
<i>G. gallus</i>	89	AARLQGLQKLLTESVRFAPYEVQRQGEAVSRLQADLAARRHSCSPRR--	136
<i>D. rerio</i>	90	TVKFQQLQKFLNDSVRFLLTQYEIRQAQESLQKLQSSITDKREEILPKKFF	139
<i>D. melanogaster</i>	83	TVEIQDLQRYLTASTMFLPDFKIKSCQNILNLTAVSDETRQRLPKKFF	132
<i>H. sapiens</i>	138	AFK-----TRGKDAA	147
<i>M. musculus</i>	137	AFK-----ARCKDAA	146
<i>G. gallus</i>		-----	
<i>D. rerio</i>	140	AFR-----SRNTSKQ	149
<i>D. melanogaster</i>	133	GFS-----GKKTVTK	142
<i>H. sapiens</i>	148	SSTKVDAAPGIIPPAVE-----SIQDSPLPKKAEGDL-GPSWVCGFSNL	189
<i>M. musculus</i>	147	GTAQVDAAP-----VA-----SAAPSPVTKEEEGAP-GASWACGFSNL	184
<i>G. gallus</i>		-----	
<i>D. rerio</i>	150	QQP-----TPIQQ-----QTADKPAPGSGVTVVV-DAADQCGFSNV	184
<i>D. melanogaster</i>	143	PKV-----PPNKD-----IVDAKLSKVPEKLSN---FTWTIANR	174
<i>H. sapiens</i>	190	ESQVLEK--RASELHQRDVLLTELSNCTVRLY-----GNPNTLRLT	228
<i>M. musculus</i>	185	ESQDLEK--RAEELHQRDVLLSDLTNCTVKLC-----GNPNTLRLA	223
<i>G. gallus</i>	137	-----SSPSAI---	142
<i>D. rerio</i>	185	DNQVLVR--QAEELHQRDVLLSHLTHCKVRLY-----GCPSTLHVK	223
<i>D. melanogaster</i>	175	TNEHIVL--DSAKVNGQDITISKLNHCLVELQ-----GHPGVSQVS	213
<i>H. sapiens</i>	229	KAHSCKLLCGPVSTSVFLEDCSDCVLAVACQQLRIHSTKDRIFLQVTSR	278
<i>M. musculus</i>	224	KARGCKVLCGPVTTSVFLEDCRDCVLAVACQQLRVHTTKDTRVFLQVTSR	273
<i>G. gallus</i>		-----	
<i>D. rerio</i>	224	NIRSCEIMCGPVSSSVFVDQCTDSTLVFPCCQQLRTHNTTATRVYLHVTSR	273
<i>D. melanogaster</i>	214	RASKCTLLCGPIARSFFAENLEDCTLSIACQQLRLHSSRSIRIYMHVTCR	263
<i>H. sapiens</i>	279	AIVEDCSGIQFAPYTWSYPEIDKDFESSGLDRSKNNWVDVDFNWLARM	328
<i>M. musculus</i>	274	AIVEDCSGIQFAPYTWSYPGIDKDFQDSGLDRSKNNWQVDDVDFNWLARNV	323
<i>G. gallus</i>		-----	
<i>D. rerio</i>	274	AIIEDCQGVSFAPFTWTYPGILDHFKVAGLSPDRNNWTEVDDVDFNWLAAGT	323
<i>D. melanogaster</i>	264	AIIEDCKSIEIGEYNYDYSKLEADYLASGLNKAQNNYTDVADFNWLSPDV	313
<i>H. sapiens</i>	329	ASPNSILP-----EEERNIQWD-----	346
<i>M. musculus</i>	324	ASPNSILP-----EEERDIQWD-----	341
<i>G. gallus</i>		-----	
<i>D. rerio</i>	324	PSPNWTVIP-----ESERICSWDFVGTAAEQS-----	350
<i>D. melanogaster</i>	314	PSPNSLLKDYDPDNWALRRDFIANNHNSLQVVKDISII-----	355

TBCD

<i>H. sapiens</i>	1	-----MALSDPEAAGPEEEA-----EDELAFG	24
<i>M. musculus</i>	1	-----MVLSNEPAAASAEVEV-----EDDALVRA	24
<i>G. gallus</i>	1	-----MAVGETDGAAGSEESGSR-----EADVISR	25
<i>D. rerio</i>	1	-----MEGACNGE-----DAEVLQA	16
<i>D. melanogaster</i>	1	-----MSNSVEECKDED-----LPA	15
<i>H. sapiens</i>	25	AALEAFGESAE--TRALLGRLEVHGGAEREVALERFRVIMDKYQEOPH	72
<i>M. musculus</i>	25	SALEAFGESAE--TRALLRSLPAVHRERASREVAEERFRVIMDKYQEOPH	72
<i>G. gallus</i>	26	NILESFTESE--VRALLGNLRTVYGDPAQEVIVEKFIIVIMDKYQEOPH	73
<i>D. rerio</i>	17	CVLSEFTES--TRALISSLPDIHHDVTSREATIEKFVIMDRYQEOPH	64
<i>D. melanogaster</i>	16	NTLEHFTLQ--VLEMIDNI--KSI AANTFEREFQYAVLSRYQEOPH	61
<i>H. sapiens</i>	73	LLDPHLEWMMNLLLDIVQDQTPAS-----LVHLAFKFLYIITKVRG	114
<i>M. musculus</i>	73	LLDPHLEWMMNLLLDVQDETSLPD-----LVHLAFKFLYIITKVRG	114
<i>G. gallus</i>	74	LLDRHLEWMMNLLLDIIRDSGSPV-----LFHLAFKFLYIITKVRG	115
<i>D. rerio</i>	65	LLDPHLEWMLNMLEMIRSEKSPPL-----LVHLCFKFLYIITKVRG	106
<i>D. melanogaster</i>	62	LLDPHLEELGKLLHKIRKPDLDTG-----ELHAAPKFLYIITKVRT	103
<i>H. sapiens</i>	115	YKFLRLRFPHEVADVEPVLDTIQN-----PKDHEAWETRYMLLL	155
<i>M. musculus</i>	115	YKFLRLRFPHEVANVQPVLDMFTGQN-----PKDHEAWETRYMLLL	155
<i>G. gallus</i>	116	YKFLRLRFPHEVTDLQPVLDMIVDQN-----PKDHEAWETRYMLLL	156
<i>D. rerio</i>	107	YKIFMQLRFPHEVSDVQPVLDLRCRQD-----QKDEAWETRYMILL	147

<i>D. melanogaster</i>	104	YKVLVKFMPHELSDLEFVLDLLGQQN-----PKEFEQWETRYILLL	144
<i>H. sapiens</i>	156	WLSVTCLIPFDFSRLDGNLLTQP-----GQARMSIMDRILQIAE	194
<i>M. musculus</i>	156	WLSVTCLIPFDFSRLDGNLSTQT-----GETRVPTMDRILQIAE	194
<i>G. gallus</i>	157	WLSMICLIPFDFLRFDGNILSEE-----GHTRMPTMDRILEIAK	195
<i>D. rerio</i>	148	WLSMTCLIPFDFLSRLDGHLSSTVP-----GTNRESTMDRILEVAK	186
<i>D. melanogaster</i>	145	WMSILVLNPFHMSRLDAYDTSTSAPTTNCSPVNVHVQSKNTKMDRIFELIQ	194
<i>H. sapiens</i>	195	SYLIVSDKARDAAAVLVSRFITRPDVKQSKMAEFLDWSLCLNARSSSQTM	244
<i>M. musculus</i>	195	SYLVVSDKARDAAAVLVSKFITRPDVKQRKMASFLDWSLCTLAHSSSQTI	244
<i>G. gallus</i>	196	CYLIVSDKARDAAAVLVSKFIVRDPVQRKRMADFLDWTLMSLSKSSSQSM	245
<i>D. rerio</i>	187	SFLRVSDKSRDAASVLVSKFVTRPDVKQKRLGDFLDWCLTTISQSSQEMTM	236
<i>D. melanogaster</i>	195	LYVSSNDTCSMAAFLAAKYFIRSDIKDLYLERFLDWIMEQHQAADTLN-	242
<i>H. sapiens</i>	245	QGVITMDGTLQALAQIFKHGKREDCLPYAATVLR-CLDGCRLPE-SNQTLL	292
<i>M. musculus</i>	245	EGVITMDGMLQALAQIFKHGKREDCLPYANTVLR-CLDGCRLPE-SSHTS	292
<i>G. gallus</i>	246	EGTVVMNGMLQALAQIFKHGKREDCLPYAATVLE-CLDNCKLSE-SNQMV	293
<i>D. rerio</i>	237	EGTVILDGALQSLAQIFKHGKRDDFLQYAPTVLE-CLNQKKIAE-SNQAT	284
<i>D. melanogaster</i>	243	----VKFGQLAAVAAILKHGKREDDLPLPYADKLLQ-WITSQYKD-DNDFL	286
<i>H. sapiens</i>	293	LRKLGVKLVQRLGLTFLKPKVAAWRYQRGCRSLAANLQLLTQGGQSEQKP-	341
<i>M. musculus</i>	293	LRKLGVKLVQRLGLTFLKPKVATWRYQRGCRSLAANLKLCPAGKSDQKL-	341
<i>G. gallus</i>	294	LRKLGKLVQRLGLTFFVKPKVAKWRYQRGCRSLAANLQAQSSVMQSQKI-	342
<i>D. rerio</i>	285	LRKLGKVVQRLGLTFLKPKLAKWRYQRGCRSLAVNLAQSSVTSVEAT-	333
<i>M. melanogaster</i>	287	KYKNYVKI IQRIGLVHLKPRIASWRYKRGTRSLATNLNQTTAAGGEPVV-	335
<i>H. sapiens</i>	342	----L--ILTEDDEDD-DVPEGVERVIEQLLVGLKDKDTVVRWSAAKGI	384
<i>M. musculus</i>	342	----LSDSLTSDGDEDD-DVPEGVETVIEQLLVGLKDKDTVVRWSAAKGI	386
<i>G. gallus</i>	343	----TVAANEAEDEEY-DIPGEIENVVEQLLVGLKDKDTIVRWSAAKGI	387
<i>D. rerio</i>	334	----KPDLESVSQEEDY-DIPQEVENVIEQLLVGLKDKKETIVRWSAAKGI	378
<i>M. melanogaster</i>	336	----LEQSL EEGEEI---VVPDAIEEVIEELLQALRSGGNDIRWSAAKGL	378
<i>H. sapiens</i>	385	GRMAGRLPRALADDVVGSLDCFSFQETDKAWHGGCLALAE LGRGRLLLP	434
<i>M. musculus</i>	387	GRMAGRLPRELADDVVGSLDCFSFQETDKAWHGGCLALAE LGRGRLLLP	436
<i>G. gallus</i>	388	GRI TGRLPKELADDVVGSLDCFSFQETDNAWHGGCLALAE LGRGRLLLP	437
<i>D. rerio</i>	379	GRVTGRLPKELADDVVESVLDLDCFSFQETDNAWHGGCLALAE LGRGRLLLP	428
<i>D. melanogaster</i>	379	GRVTNRLPKELADEVIGSVIDILNPLEPHEAWHGA LALAE LAKRGLLLP	428
<i>H. sapiens</i>	435	SRLVDVVAVILKALTYDEKRGACSVGTNVRDAACYVCWAFARAYEPQELK	484
<i>M. musculus</i>	437	SRLSEVVTVILKALTYDEKRGACSVGANVRDAACYVCWAFARAYEPQELT	486
<i>G. gallus</i>	438	SRI SDVVPVILKALTYDEKRGACSVGSNLDAACYLSWAFARAYDPSELI	487
<i>D. rerio</i>	429	SRLSDVVPVILKALTYDEKRGACSLGNSNVRDAGCYVCWAFARAYEPTELK	478
<i>D. melanogaster</i>	429	HRLEELVPLLMQALFYDEMKGYSVGVQHIRDSACYMCWAFARAYNPDDVK	478
<i>H. sapiens</i>	485	PFVTAISSALVIAAVFDRDINCRRAASAAFQENVGRQGTFFPHGIDILTTA	534
<i>M. musculus</i>	487	PFVTAISSALVIAAVFDRNVNCRRAASAAFQENVGRQGTFFPHGIDILTTA	536
<i>G. gallus</i>	488	PFINQISSALVIAAVFDRDINCRRAASAAFQENVGRQGTFFPHGIDILTTA	537
<i>D. rerio</i>	479	PYVNQIASSLVIATVDFDRNVTCKRAASAAFQENVGRQGTFFPHGIDIITAA	528
<i>D. melanogaster</i>	479	PFVHKISSGLLTVAVFDREVNCRRAASAAFQESVGRGLGNFFPGIEISTTT	528
<i>H. sapiens</i>	535	DYFAVGNRSNCFLVISVFIAGFPEYTPQPMIDHLVMTKISHWDGVIRELAA	584
<i>M. musculus</i>	537	DYFAVGNISNCFLIISVFIAGFQEYTKPMIDHLVSMKINHWDGAIRELSA	586
<i>G. gallus</i>	538	DYFAVGNRVNICYLTISVYIAGFPEYTPQPMIDHLVNMKINHWDVIRELST	587
<i>D. rerio</i>	529	DYFTVGNLNNCYLTISVYIAGFPEYTKPLIDHLVAMKINHWDGAIRELAT	578
<i>D. melanogaster</i>	529	DFYSVGIQNSYLNISDYIAQFEVYREPLINHLVQHKVSHWDSAIRELTA	578
<i>H. sapiens</i>	585	RALHNLAQQAPEFSATQVFPRLLSMTLSPDLHMRHGSILACA EVAYALYK	634
<i>M. musculus</i>	587	KALHNLTPQVPEYIAMHVFPALLLMTQSPDLHTRHGAILACA EVTYALYK	636
<i>G. gallus</i>	588	KALHNLTPRAPEYMANVVLPRLLPLSVGTDLHTRHGAILACA EITHALCK	637
<i>D. rerio</i>	579	KALHNLTIQAPEYMANVLPQLLPMATGMDLHTRHGAILACA EITHALYK	628
<i>D. melanogaster</i>	579	KALHKLSLWEPEYMAAVVLPQLLAKTDTIDINCRHGCVLAMGEITLTLRK	628
<i>H. sapiens</i>	635	L--AAQENRPVTDHLDEQAVQGLKQIHQQLYDRQLYRGLGGQLMRQAVCV	682
<i>M. musculus</i>	637	L--ATQSNRLVTDYLDEKAVQSLKQIHQQLCDRHLYRGLGGELMRQAVCI	684
<i>G. gallus</i>	638	L--AEENRSITYYFNGKSLGLEKQIHQELCSRQLYRGLGGELMRPAVCT	685
<i>D. rerio</i>	629	L--AAQNNRSVTDLMSSDTIEGLKDIHQKLSDRKQYRGGELMRPAVCS	676
<i>D. melanoga</i>	629	L--EEKSDPQVVYLSNQRVAEL-NELIITFLDKNFYRGMGDLMKSCSTSS	675
<i>H. sapiens</i>	683	LIEKLSLSKMPFRGDTVIDGWQWLINDTLRHLHLISSHSRQQMKDAAVSA	732
<i>M. musculus</i>	685	LIEKLSLSRMPFKGDATVEGWQWLINDTLRS LHLVSSHSRQQIKAVAVSA	734
<i>G. gallus</i>	686	LIEKLSLSKMPFKGDPIIEGWQWLINDSLRSLPLASCAARQHVKEAVSA	735
<i>D. rerio</i>	677	LIEKLSLSKMPFKDEPVIAGWQWLIDDSLKNLHLFSSGVRRIQDAAVSA	726
<i>D. melanogaster</i>	676	YIKNCSLAKLQATP-ECLVSWQKVIDSCLIT-----KSNAIRDGAWEA	717

<i>H. sapiens</i>	733	LAALCSEYYMKEPGEADPAIQEELITQYLAE LRNP-EEMTRCGFSSALGA	781
<i>M. musculus</i>	735	LTALCSEYYVKEPGEAGSSI AKELIPQYLAE LQSP-EEMARCGFSSALGA	783
<i>G. gallus</i>	736	LSALCNEYIINENGEADPALQGE LVTQYISELQST-EQMIRCGFSSALGA	784
<i>D. rerio</i>	727	LAALCWQYYQVEPQVADV KMQEELVSQYLSALQSP-EVLTTRCGCALALGS	775
<i>D. melanogaster</i>	718	FGELCTTYCSDS--R-HGENEAIINTYLTGADNDLEEHIRMGYIAALGV	764
<i>H. sapiens</i>	782	LPGFLLKGR LQQVLTGLRAVTHTS--PED-----VSFAESR	815
<i>M. musculus</i>	784	LPGFLLRGLHQVLSGLRRVTCIS-PND-----VSFAEAR	817
<i>G. gallus</i>	785	LPRFLLKGR LQQVLEGLRKTIT-PRD-----VSFAESR	818
<i>D. rerio</i>	776	LPPFMIHNK LQQIILSGLQATCRVA-QKG-----ESLTEAR	809
<i>D. melanogaster</i>	765	LPSFMIRCHLQAILD SLVKHSLT--PLQAVLVGEMGDRENIQAYRWSEAR	812
<i>H. sapiens</i>	816	RDGLKAIARICQTVG-----VKA-GAPDE-AVCGENVSQIYCALLGCM	856
<i>M. musculus</i>	818	RDGLKAISRICQTVG-----VNTRGPPDE-VICKENISEVY AALLGCM	859
<i>G. gallus</i>	819	RDALIAIAEICQTVG-----VKGEGSQEE-YICKDNVAQIYATLLNCV	860
<i>D. rerio</i>	810	RDAATAMSQVCVAVG-----VCAQGRSDQ-VLCE DNIRPVYEALLGCM	851
<i>D. melanogaster</i>	813	TQSVLALTKLVKTVGYGGGIDSF AEPKFNK-VI-----ECLLRAL	852
<i>H. sapiens</i>	857	DDYTTDSRGDVGTVWRKAAMTSLMDL TLLLARS-----	889
<i>M. musculus</i>	860	SDYTTDSRGDVGAWVREAAMTSLMDL MLLLART-----	892
<i>G. gallus</i>	861	TDYTTDSRGDVGWVREAAMTSLMKV TLLLVQN-----	893
<i>D. rerio</i>	852	NDYSTDSRGDVGAWVRAAAMSSLM DVTLVVAS-----	884
<i>D. melanogaster</i>	853	QEYTLDNRRGDIGAWVREAAMSSLYE---IVTTC-----	882
<i>H. sapiens</i>	890	-----QPELIEAHTCERIMCCVAQQA SEKIDRFRAHAASVFLTLL	929
<i>M. musculus</i>	893	-----EPV LIEAHCERVMCCVAQQA SEKIDRFRAHAARVFLTLL	932
<i>G. gallus</i>	894	-----EAE LINANICKQIMCWLAQQA SEKIDKFRAHAGSVFLTLL	933
<i>D. rerio</i>	885	-----APE LSSDLVLRMMCCLAQQA AEKIDRYRAHAGTVFLRLL	924
<i>D. melanogaster</i>	883	-----PPD LLAPEQVHEIVVGF MQQAVEKIDRTRGLGGR LCCQLI	922
<i>H. sapiens</i>	930	HFDSPPIPHVPHRGELEKLFPRSDVASV NWSAPSQAFPRITQLLGLPTYR	979
<i>M. musculus</i>	933	HFDSPPIPHVPHRQELES LFPRSDVATVNNWAPSQAFPLITQLLGLPTYR	982
<i>G. gallus</i>	934	HFDSPPVPHIPHR EELERIFPRSE AETLNWNAASEAFPRITQLLALPAYQ	983
<i>D. rerio</i>	925	HGTDPVAVPHIPHE ELLSIFPPE TGNLSLNWNAASQAFPHITQLLRLPQYQ	974
<i>D. melanogaster</i>	923	HHQ-PRIPYIREH SKLLEIFPA-DADSVLWLFADHTFPLFCELLSLPDYS	970
<i>H. sapiens</i>	980	YHVL LGLVSVLGLTESTIRHSTQSLFEYMKGIQSDPQALGS----FSG	1024
<i>M. musculus</i>	983	YHVL LGLAVSVGGLTESTVRHSTQSLFEYMKGIQDAQVLS----FSE	1027
<i>G. gallus</i>	984	YYVL LGLSVSVGGLTETT-----GVCAPPDNAGP----NAG	1015
<i>D. rerio</i>	975	YHTL LGLCVSVGGLTESTVRFSSQSLFDY LKGIQDFTMLQQ----FGD	1019
<i>D. melanogaster</i>	971	KRVLLGLSASIGQLTESL IKYASSALFHFLR---SNPETVPR----LCS	1012
<i>H. sapiens</i>	1025	TLLQIFEDNLLNERVSVPL LKTLDHVLT HGCDFIFT---TEEDH--PFA	1068
<i>M. musculus</i>	1028	TLLKVFEDNLLNDRVSVS-LLKMLDQ LLANGCDFIFT---AEENH--PFC	1071
<i>G. gallus</i>	1016	KRL-----	1018
<i>D. rerio</i>	1020	TLLRIFRDNLRNDRVSVPL LKMVDQILANGCDFLFT---RQESH--PFC	1063
<i>D. melanogaster</i>	1013	EVVQIFEEHLLNERVTYP-LLSFLDILIGSGTVESVL---HDEAN--PFA	1056
<i>H. sapiens</i>	1069	VKLLALCKKEIKNSKDIQKLLSGIAV-----	1094
<i>M. musculus</i>	1072	VKLLTLCKEEIKKSKDIQKLRSSIAV-----	1097
<i>G. gallus</i>		-----	
<i>D. rerio</i>	1064	VELLSLCKEEIKKSKDVQKLLSCIAV-----	1089
<i>D. melanogaster</i>	1057	EDIFRLLNLEVKG YKKLYKTATSISA-----	1082
<i>H. sapiens</i>	1095	-----FCEMVQFP GDVRRQALLQLC LLLCHRFP LIRKTTAS	1130
<i>M. musculus</i>	1098	-----LCGMVQFNGDVRKKILLQLF LLLGHFPFVIRKSTAS	1133
<i>G. gallus</i>	1019	-----F-----	1019
<i>D. rerio</i>	1090	-----FCGLVQFP GDVRRKVLVQLML LLLCHFP LIRKTTAS	1125
<i>D. melanogaster</i>	1083	-----FCQLLQVP-RLSKRILSKLSV FLGLQHVHVRKTAAT	1189

TBCE

<i>H. sapiens</i>	1	---MSD TLTADVIGRRVEVNGEH---ATVRFAGVPPVAGP-WLGV EWD	42
<i>M. musculus</i>	1	---MSD ILPLDVIGRRVEVNGEY---ATVRFAGVPPVAGL-WLGV EWD	42
<i>G. gallus</i>	1	---MAAGVPADALGRRVLCGTEY---GTVRYVGSVSPTAGV-WLGV EWD	42
<i>D. rerio</i>	1	-----MLDEAVGRRVCCDGER---GTVRYVGPVPTAGV-WLGV EWD	38
<i>D. melanogaster</i>	1	MVGIIDEVQLFYPLGTRIKIGDNY---GTVRYVGEVSGHMGS-WLGV EWD	46
<i>C. elegans</i>	1	-----MEIGQRVRINFEV---ATVRYIGEVDGYGSRQWVGL EWD	36
<i>H. sapiens</i>	43	NPERGKHDGSHEGT VYFKC--RHPTGGSFIRPNK-VNFGTDFLTA IKNRY	89
<i>M. musculus</i>	43	NPERGKHDGSHEGTMYFKC--RHPTGGSFVRPSK-VNFGDDFLTALKKRY	89
<i>G. gallus</i>	43	DPQRGKHDTYEGKQYFKC--RHPRGGSFIRPNK-ANFGVDFLTAVKGRY	89
<i>D. rerio</i>	39	HPERGKHDGSHDGVRYFTC--RHPTGGSFVRPQK-ASFGVDYVTALKQRY	85
<i>D. melanogaster</i>	47	DGLRGKHNGIVDGKRYFQT--QTPTGGSFIRPGK-VGPCATLEDAARERY	93
<i>C. elegans</i>	37	DPTRGKHDIVRGKRYFQT--RHPNGGSLMKHEI-VKPTDLLFEIKDRY	83

Tabla M-4: Haplotipos seleccionados utilizando el HapMap y esquema de cada gen de TBCs con la ubicación de sus respectivos SNPs (tesis Valiente, 2009).

Taggin SNPs / Gen Arl2:

SNP: rs660165			
Posición genómica:	Chr11: 64545574	Alelos:	A / T
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	Arl2	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	AGGGGCACCTGGGCTCTCTGTCCAGT[A/T]CCATGCCAGTGCTGCCCCTTAGTGA		

SNPs Codificantes / Gen Arl2:

SNP: rs664226			
Posición genómica:	Chr11: 64545770	Alelos:	C / T
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	141
Gen-Proteína:	Arl2	Cambio Aminoácido:	Val [V] / Ala [A]
Secuencia:	ACCATCAGCACCTTTGTCTCCAGG[C/T]CCTGGAGCTGGACTCCATCCGCAGC		

Taggin SNPs / Gen TBCA:

SNP: rs458349			
Posición genómica:	Chr5: 77088500	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCA	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	ttcttaagagttcgagtcattaaaa[A/G]ccttctctagacctttctgtgtac		

SNP: rs352568			
Posición genómica:	Chr5: 77083229	Alelos:	C / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCA	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	CCACCAAATCTTAATTTTGTCCATA[C/G]CACtgaaccgccaaggggtcac		

SNP: rs164813			
Posición genómica:	Chr5: 77075013	Alelos:	C / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCA	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	AAATGGAGAGGAAGTTAGAGAAAGCT[C/G]GAAGAGTCATCAGACTACAATGCAG		

SNP: rs16874582			
Posición genómica:	Chr5: 77074801	Alelos:	C / T
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCA	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	TTACTACCTTACTAATGGATAGCATA[C/T]AGCGGTTAGAGGTATGGACTAAGAT		

SNP: rs254422			
Posición genómica:	Chr5: 77073428	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCA	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	TACCCTGAGCTACTCTGAATATCCCA[A/G]TCAGAGTACTCTCTAATATTGA		

SNP Codificante / Gen TBCA:

SNP: rs1802165			
Posición genómica:	Chr5: 77039855	Alelos:	G / T
Función genómica:	Nonsense	Posición Proteína:	43
Gen-Proteína:	TBCA	Cambio Aminoácido:	Glu [E] / OCH [X]
Secuencia:	AGAAAAGATTGAAAAAATGAGAGCT[G/T]AAGACGGTGAAAATTATGACATTAA		

Taggin SNPs / Gen TBCB:

SNP: rs10425700			
Posición genómica:	Chr19: 41301630	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCB	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	CCCCTCTGGCTGTGTGTGGGAACAG[A/G]TGGTGGAGGACAGGAAGAGTAGGGA		

SNP: rs2239510			
Posición genómica:	Chr19: 41303124	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCB	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	GTCCCAGAGGCCATCGAGGAGATGC[A/G]CTGTGCACAGGGCTGTGGCAAGGC		

SNPs Codificantes / Gen TBCB:

SNP: rs1046975			
Posición genómica:	Chr19: 41304297	Alelos:	A / C
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	128
Gen-Proteína:	TBCB	Cambio Aminoácido:	Ser [A] / Arg [R]
Secuencia:	ACGGTCCGCTCTTCTGAAGCGCAG[A/C]AAGCTCGCCGGTACAACGAGGAGG		

SNP: rs11545601			
Posición genómica:	Chr19: 41304365	Alelos:	A / G
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	151
Gen-Proteína:	TBCB	Cambio Aminoácido:	Glu [E] / Gly [G]
Secuencia:	GGCCGAGGCCGCCAGCGCCTGGCCG[A/G]GGAGAAGGCCAGGCCAGCTCCATC		

SNP: rs35581971			
Posición genómica:	Chr19: 41304393-4	Alelos:	- / C
Función genómica:	Frameshift	Posición Proteína:	160
Gen-Proteína:	TBCB	Cambio Aminoácido:	Pro [P] / [P]
Secuencia:	AGAAGGCCAGGCCAGCTCCATCCCC[-/C]GTGGGCAGCCGCTGTGAGGTGCGGG		

SNP: rs1803271			
Posición genómica:	Chr19: 41304449	Alelos:	A / T
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	179
Gen-Proteína:	TBCB	Cambio Aminoácido:	Val [V] / Asp [D]
Secuencia:	GGACAATCCCCTGCCGGGCACCG[A/T]CATGTATGTAGGTCTCACAGATTTC		

SNP: rs1801990			
Posición genómica:	Chr19: 41308244	Alelos:	A / C
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	200
Gen-Proteína:	TBCB	Cambio Aminoácido:	Pro [P] / Gln [Q]
Secuencia:	TGGATTGGTGTCCGCTATGATGAGC[A/C]ACTGGGGAAAATGATGGCAGTGTG		

SNP: rs1801989			
Posición genómica:	Chr19: 41308493	Alelos:	C / T
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	235
Gen-Proteína:	TBCB	Cambio Aminoácido:	Pro [P] / Leu [L]
Secuencia:	GCAGTCGTGACGGTGGGGACTTCC[C/T]GGAGGAGGACTACGGGTTGGACGAG		

Taggin SNPs / Gen TBCD:

SNP: rs2263123			
Posición genómica:	Chr17: 78368158	Alelos:	G / T
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCD	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	tgtatgtctctttggagaaatgtct[G/T]tcaagttcttactcatttaaaaa		

SNP: rs10163502			
Posición genómica:	Chr17: 78384385	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCD	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	CACAGAGCGTGGGCTGGCCACCGTCT[A/G]CTTGCTCCTACCTGCTGGCTGGGAG		

SNP: rs9303014			
Posición genómica:	Chr17: 78417658	Alelos:	G / T
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCD	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	TAGGACTCCCGGGGATGCCGTCAGCA[G/T]CCAGGCCTTGGCAGCTGCCGCTTCA		

SNP: rs12945629			
Posición genómica:	Chr17: 78427736	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCD	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	TATTTATTCTCGATGAGCCAGTTTT[A/G]TTCTGAGAATGAGAAAATAGACCG		

SNP: rs8067926			
Posición genómica:	Chr17: 78431877	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCD	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	GGGTCCCTACCGCAGGCTCCCCACAC[A/G]GTGACACCTGTCTGTCCGTCCT		

SNP: rs8072584			
Posición genómica:	Chr17: 78432504	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCD	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	GATCCGTGGTTGTTAGTAATTAACCA[A/G]AGTAAACGGTAGCTCATTCCGGTCAG		

SNP: rs3214033			
Posición genómica:	Chr17: 78480352	Alelos:	C / T
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	923
Gen-Proteína:	TBCD	Cambio Aminoácido:	Ser [S] / Asn [N]
Secuencia:	CAAAGTGCAGGAGCGTCAGGAACACG[C/T]TGGCGGCGTGAGCACGGAAACGGTC		

SNP: rs8072406			
Posición genómica:	Chr17: 78480412	Alelos:	G / T
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	943
Gen-Proteína:	TBCD	Cambio Aminoácido:	Gly [G] / Val [V]
Secuencia:	TCCCATCCCCACGTGCCACCGAG[G/T]AGAACTGGAAAAGCTGTTCCAGG		

SNP: rs11550066			
Posición genómica:	Chr17: 78488437	Alelos:	C / T
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	1065
Gen-Proteína:	TBCD	Cambio Aminoácido:	His [H] / Tyr [Y]
Secuencia:	TCGACATCTTACCACGGAGGAGAC[C/T]ACCCCTTTGCTGTGAAGTTGCTTGC		

SNP: rs16832611			
Posición genómica:	Chr1: 233660696	Alelos:	C / T
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	205
Gen-Proteína:	TBCE	Cambio Aminoácido:	Val [V] / Ala [A]
Secuencia:	TTCAGTATTAACCTGGAACGCTTCTG[C/T]ACTGAAGTTTTAGTCCTCAATCAA		

SNP: rs35579976			
Posición genómica:	Chr1: 233667294	Alelos:	C / G
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	333
Gen-Proteína:	TBCE	Cambio Aminoácido:	Ser [S] / Thr [T]
Secuencia:	TTCAATGAGCTAGAGAAGTTACCAA[C/G]TCTACGGGCTTGTCTGCCTAAGA		

SNP: rs16832619			
Posición genómica:	Chr1: 233668816	Alelos:	A / G
Función genómica:	Missense	Posición Proteína:	409
Gen-Proteína:	TBCE	Cambio Aminoácido:	Glu [E] / Gly [G]
Secuencia:	GGATCCGAAAAAACAGACTCAGCG[A/G]AGAATTCCTCACAGCCCATCCAGA		

Taggin SNPs / Gen TBCE:

SNP: rs12745648			
Posición genómica:	Chr1: 233605643	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCE	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	TTCACGGAAGATCATGGTATCAAGAA[A/G]GACATTATTAGAAACGTTTCAGAGAC		

SNP: rs6656673			
Posición genómica:	Chr1: 233599000	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCE	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	ttatcacttcaactgttcaagttac[A/G]ttgtctctacttgaacttcag		

SNP: rs4659821			
Posición genómica:	Chr1: 233607439	Alelos:	C / T
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCE	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	agccTAATGTTATTGTTTTACAAA[C/T]ATTTGAGGAGCTGATTGAGAGGACC		

SNP: rs2153204			
Posición genómica:	Chr1: 233647005	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCE	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	TCTACTTTAAGCCATTGTCTTATCTC[A/G]TCAATAAAAATCCAGCTGACCAGCTT		

SNP: rs2291688			
Posición genómica:	Chr1: 233660873	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCE	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	TAAATCATCCCAGTATCTATTAATAG[A/G]TAACAAGATTCATTAAGTGCCTTA		

SNP: rs6429094			
Posición genómica:	Chr1: 233677716	Alelos:	A / G
Función genómica:	Intrón	Posición Proteína:	NA
Gen-Proteína:	TBCE	Cambio Aminoácido:	NA
Secuencia:	GTTTATTCAGATTAAGAAAGAAATAC[A/G]CTACTGAAATGGTATGAAACTCACT		

La selección de los 24 tagSNPs que se incluyeron en el Chip para realizar los estudios de haplotipos, se realizó utilizando el mapa de haplotipos desarrollado por el proyecto internacional HapMap que contiene las variaciones comunes de las secuencias humanas con el fin de guiar estudios genéticos en contextos de salud y enfermedad (Internacional HapMap Consortium, 2003, 2005 y 2007). Utilizando los criterios de Tagger Población CEU, Algoritmo Multimaker, RS cut off 0.8/MAF cut off 0.2, se seleccionaron los tagSNP que caracterizaban por completo a los genes de los TBCs quedando cubierta el 95 % de la variabilidad genética. De esta manera en un futuro, podríamos asociar un fenotipo patológico a un haplotipo específico y estudiar la mutación producida en el coding SNP para uno de los TBCs. (Tabla M-4).

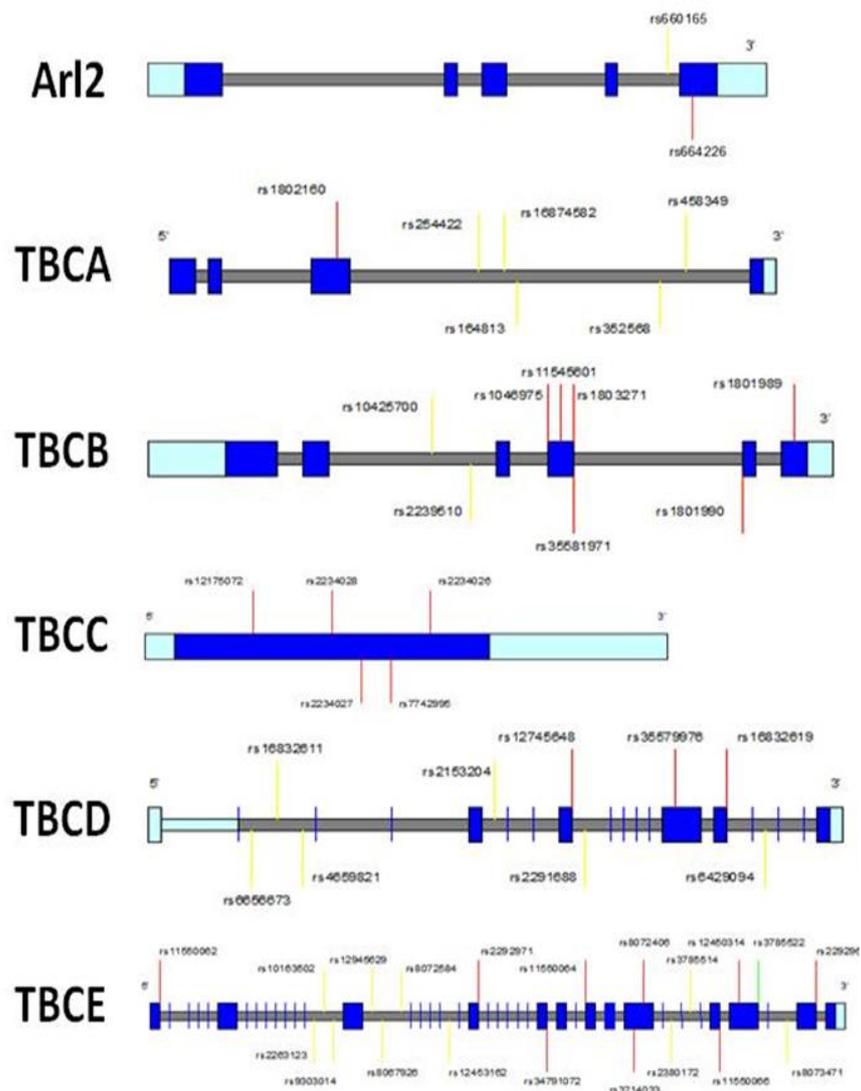


Fig.M-7: Haplotipos seleccionados utilizando el HapMap y esquema de cada gen de TBCs con la ubicación de los tagSNPs (amarillo) y SNPs codificantes (rojo) elegidos a lo largo de los genes de los cofactores (tesis Valiente, 2009).

Tagging SNPs (total 27): (i) Arl2: rs660165; (ii) TBCA: rs352568, rs164813, rs16874582, rs254422, rs254387 (iii) TBCB: rs10425700, rs2239510. (iv) TBCD: rs1127986, rs10163502, rs9303014, rs2263123, rs2380172, rs12453162, rs3785522, rs8067926, rs12945629, rs8073471, rs8072584, rs3785514, (v) TBCE: rs12745648, rs2153204, rs2291688, rs6656673, rs4659821, rs6429094. (vi) TBCC: no hay tagging SNPs

SNPs codificantes (total 21): (i) Arl2: rs664226, (ii) TBCA: rs1802165, (iii) TBCB: rs11545599, rs1046975, rs11545601, rs1803271, rs1801990, rs1801989, (iv) TBCD: rs11550062, rs2292971, rs34791072, rs11550064, rs3214033, rs8072406, rs11550066, rs12450314, rs3785522, rs2292969, (v) TBCE: rs16832611, rs35579976, rs16832619 (vi) TBCC: rs12170572, rs2234028, rs2234027, rs7742995, rs2234025

Como resultado del proceso anterior, se diseñaron placas de Chips con 348 puntos que permitían genotipar hasta 48 SNPs simultáneamente en una muestra. A continuación, el CeGen llevo a cabo la técnica de SNPLEX (Applied Biosystems) que consiste en la utilización de dos oligonucleótidos con el nucleótido del SNP en el extremo 3' y un tercer oligonucleótido común que se une a la región adyacente al SNP, para poder diferenciar los dos alelos de un SNP mediante una ligación específica de alelo. Los productos de la ligación fueron amplificados mediante PCR múltiple que emplea como cebadores las secuencias universales presentes en los oligonucleótidos. Los amplicones obtenidos, fueron hibridados con una mezcla de sondas fluorescentes (sondas ZipChute), complementarias a las secuencias ZipCode. Para la lectura e interpretación de los datos, se utilizó un analizador de ADN 3730xl (Applied Biosystems) y el software GeneMapper 3.5.

VI RESULTADOS

VI.1 Estudios Bioquímicos:

VI.1.1 Estudio de la expresión de proteínas mediante Western blot:

En primer lugar, para poder confirmar la presencia de TBCD y TBCE en los gametos humanos, se llevaron a cabo estudios bioquímicos, en concreto *western blot* en geles de poliacrilamida al 7,5%. Para ello, se utilizaron espermatozoides de eyaculado, ovocitos y células Hek293T como control positivo.

Para poder obtener una concentración de proteínas totales adecuada para realizar cada *western blot* se tuvieron que utilizar un número elevado de ovocitos entre 200 y 300 y debido a la dificultad en el tiempo necesaria para la recogida de este número elevado de células, decidimos realizar los Western blot con un pool de gametos femeninos en el que se incluyeron todos los ovocitos obtenidos independientemente de su estadio de maduración (PI, MI y MII).

Mediante esta técnica también se valoró la presencia de α y β tubulina con la ayuda de anticuerpos comerciales específicos para cada una de estas dos proteínas.

Los resultados obtenidos al realizar los *western blot* (Fig.R-1A y 1B), muestran la presencia de α y β tubulina tanto en las células Hek293T como en los espermatozoides. Se detecta una única banda de 50 kD en los dos tipos celulares, que se corresponde con el peso molecular de la tubulina. El tamaño de las bandas de β -tubulina es similar entre las células control y los espermatozoides, mientras que el tamaño de la banda correspondiente a α -tubulina es menor en las células Hek293T que en los espermatozoides.

En el caso de los ovocitos (Fig.R-1A y 1B), no se detecta la presencia ni de α - ni β -tubulina. Al analizar estos resultados, queda descartado un posible artefacto en base a la existencia de una señal razonablemente intensa en las calles correspondientes a los extractos de proteínas obtenidos de los espermatozoides y célula Hek293T. De la misma manera que queda descartado un artefacto en la extracción de proteína total (o escasa concentración de la misma) porque la cantidad de proteína total fue cuantificada al mismo tiempo y con los mismos reactivos que en los extractos obtenidos de los espermatozoides y células control mediante el test de Bradford, y además esa misma cantidad de proteína resulta suficiente para observar una señal en las inmunodetecciones

de TBCD y TBCE, que a su vez descarta un artefacto de carga en los geles de SDS-PAGE.

La única hipótesis artefactual que podría explicar este fenómeno, aunque bastante improbable porque son policlonales, es que ambos anticuerpos anti- α y anti- β -tubulina reconozcan como epítipo aminoácidos claves en la modificaciones postransduccionales que ocurren en estas células, por ejemplo acetilaciones o glutamilaciones (más probables en la α -tubulina). Una vez desechadas las posibilidad de un artefacto, concluimos que el hecho de que no hayamos detectado la presencia de α y β - tubulina en ovocitos probablemente se deba a que la concentración de estas proteínas con respecto a la concentración de proteína total es tan pequeña que posiblemente la técnica de SDS-PAGE seguida de *western blot* no tenga la suficiente sensibilidad para detectar estas cantidades.

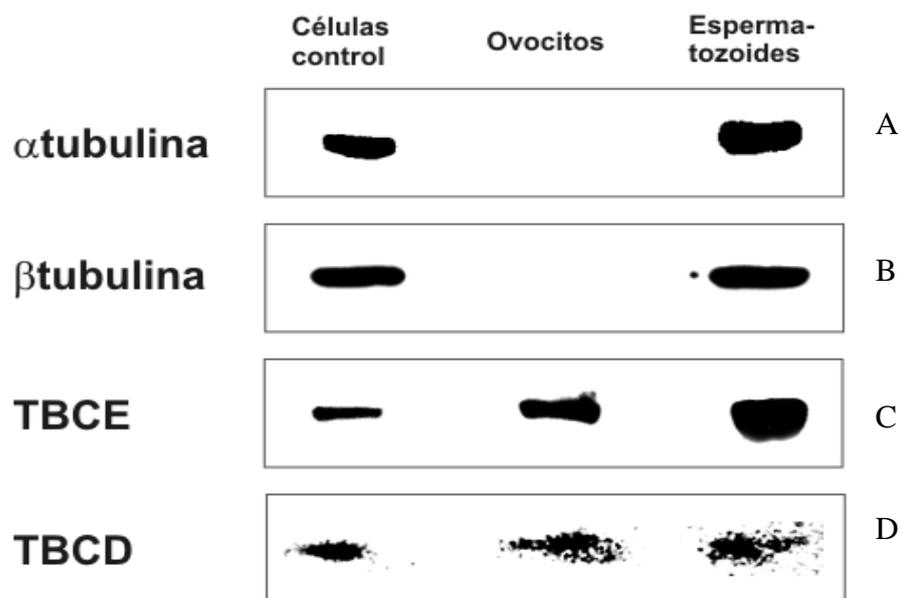


Fig.R-1: Detección de TBCD, TBCE, α - y β - tubulina mediante técnicas de western blot con anticuerpos específicos. A. Western blot realizado con anticuerpo policlonal de ratón contra α - tubulina, observándose una única banda de 50KD en los extractos de proteínas obtenidos de espermatozoides y en las células humana Hek 293T tratadas de manera similar. B. Western blot realizado en la misma membrana utilizando anticuerpos de ratón contra β -tubulina. C. Western blot realizado con anticuerpos específicos contra TBCE donde se observa una banda de 60 KDa tanto en las células Hek 293T como en los ovocitos y en los espermatozoides que se corresponde con TBCE. D. Western blot realizado con anticuerpos específicos contra TBCD donde se observa una banda de 120 KDa en los tres tipos celulares que se corresponde con TBCD.

Una vez confirmada la presencia de α - y β - tubulina, el siguiente paso fue determinar la presencia de TBCE Y TBCD en los espermatozoides, ovocitos y células Hek293T y para ello llevamos a cabo *western blot* con anticuerpos primarios contra TBCD y TBCE.

Al analizar los resultados obtenidos (Fig. 1-R) se observa la presencia de una única banda de unos 60 KDa que se corresponde con el peso molecular de TBCE en los extractos de proteína obtenidos de los tres tipos celulares, siendo la banda mayor en los espermatozoides, luego en los ovocitos y por último en las células Hek293T.

En cuanto a TBCD, su presencia es confirmada con la aparición de una única banda de 132 KDa correspondiente con su peso molecular tanto en células Hek293T como en espermatozoides y ovocitos. La intensidad de la banda obtenida en los espermatozoides y en los ovocitos fue mayor que en las células Hek293T, lo que indica que la concentración de TBCD en los gametos humanos es mayor que en las células control. La ligera diferencia de intensidad que se observó en la banda de TBCD entre los ovocitos y los espermatozoides, podría indicar que los niveles de TBCD son mayores en los espermatozoides que en los ovocitos.

Por lo tanto y en base a estos resultados, no sólo confirman la presencia de TBCE y TBCD en los gametos humanos si no que también podemos corroborar que su concentración es mayor que en las células somáticas.

VI.1.2 Estudio de la expresión del ARNm mediante RT-PCR:

Para valorar la presencia de los ARNm de TBCD y TBCE en gametos humanos se realizaron RT-PCRs en espermatozoides, ovocitos en los tres estadios de maduración (PI, MI y MII) y tejido de córtex cerebral humano como control positivo. Los genes de β -tubulina y β -actina fueron utilizados como genes de expresión constitutivos (*del termino inglés "housekeeping genes"*) y de acuerdo a los cebadores que se eligieron para analizar el ARNm de cada TBC, los tamaños de los amplicones esperados serían 167 pb para TBCE, 329 pb para TBCB, 240 pb para TBCC, 400 pb para TBCD y 406 pb para TBCE.

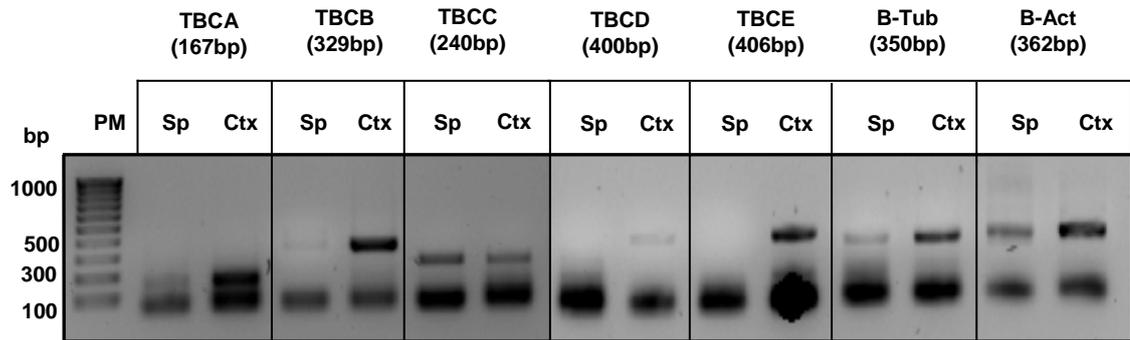


Fig.R-2: Detección de la presencia de los ARNm para los TBCs, β - tubulina y β -actina mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% utilizando bromuro de etidio como marcador de los ADNc ampliados por RT-PCR en espermatozoides y córtex cerebral. Tanto los ARNm de β -tubulina (350pb) y β -actina (362 pb) están presentes en los dos tipos celulares. También se observa la presencia de las bandas de 167 pb correspondiente a TBCA, de 329 pb correspondiente a TBCB, de 240 pb correspondiente a TBCC en los espermatozoides y en el córtex cerebral. Por otro lado, las bandas de 400 pb correspondiente a TBCD y la banda de 406 pb correspondiente a TBCE no están presentes en los espermatozoides y si se observan en el córtex cerebral. (Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Agirregoitia de la Universidad del País Vasco).

Los resultados obtenidos en espermatozoides, muestran por un lado la presencia de los ARNm de TBCA, TBCB y TBCC al detectarse las bandas de los amplicones de 167 pb, 329 pb y 240 pb respectivamente (Fig. R-2) y por otro lado, la ausencia de los ARNm para TBCD y TBCE al no detectarse la banda del amplicon de 400 pb correspondiente a TBCD y la banda del amplicon 406 pb correspondiente a TBCE (Fig.R-3). En cambio todas las bandas correspondientes a los cinco TBCs si están presentes en el córtex cerebral (Fig. R-2).

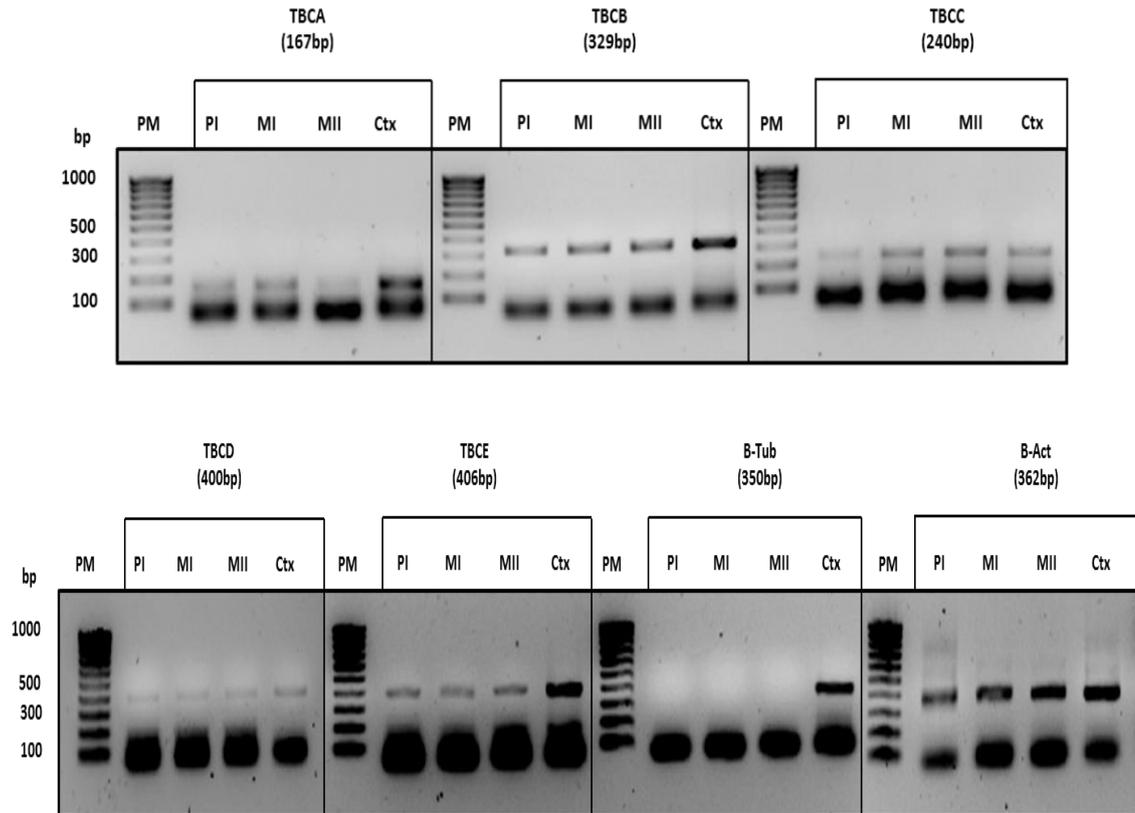


Fig.R-3: Detección de la presencia de los ARNm para los TBCs, β -tubulina y β -actina mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% utilizando bromuro de etidio como marcador de los ADNc amplificados por RT-PCR en los tres estadios madurativos de los ovocitos (PI, MI y MII) y córtex cerebral. En todos los estadios ovocitario se detectan las bandas de 167 pb correspondiente al ARNm de TBCA, de 329 pb correspondiente al ARNm de TBCB, de 240 pb correspondiente al ARNm de TBCC, de 400pb correspondiente al ARNm de TBCD y de 406 correspondiente al ARNm de TBCE. Todas estas bandas también están presentes en el córtex cerebral. La presencia del ARNm de β -actina (362 pb) se detecta tanto en los tres estadios madurativos de los ovocitos (PI, MI y MII) como en el córtex cerebral mientras que la banda de 350 pb correspondiente al ARNm de la β -tubulina se observa en el córtex cerebral y esta ausente en los ovocitos. (Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Agirregoitia de la Universidad del País Vasco).

En el caso de los ovocitos humanos, hemos comprobado la presencia de los ARNm para los cinco TBCs en todos los estadios madurativos (PI, MI y MII) mediante la presencia de las bandas de los amplicones de 167 pb, 329 pb, 240 pb, 400 pb y 406 pb correspondientes a TBCA, TBCB, TBCC, TBCD y TBCE respectivamente (Fig. R-3). Los ARNm de los cinco TBCs también se detectan en el córtex cerebral. En cuanto a los genes utilizados como *housekeeping*, tanto β -tubulina como β -actina (Fig.R-2), se expresan en espermatozoides y en el córtex cerebral. Mientras que al contrario de lo que cabría esperar, los ARNm de β -tubulina no se detectan en ovocitos en ninguno de los estadios de maduración (Fig. R-3).

VI.2 Localización de TBCD en tejido testicular:

Debido a que los MTs y los TBCs juegan un papel importante durante la espermatogénesis, para determinar la localización subcelular de TBCD y TBCE en testículos humanos, solicitamos a los pacientes de la URA que se iban a someter a una biopsia testicular como parte de los tratamientos de reproducción que nos donaran un fragmento de tejido testicular para poder realizar este parte del estudio.

VI.2.1 Microscopía electrónica:

Los fragmentos de testículo que utilizamos para realizar los estudios de microscopía electrónica procedían de pacientes que se habían sometido a una vasectomía previa y para confirmar que el tejido testicular no había sido dañado por este procedimiento con el paso de los años, los fragmentos fueron fijados, deshidratados en acetonas e incluidos en Araldita (Fluka) para posteriormente realizar cortes ultrafinos que serían estudiados al microscopio electrónico para valorar la conservación del tejido testicular obtenido.

Al observar los cortes de tejido al microscopio electrónico se pudo comprobar que el tejido testicular estaba bien conservado tal y como muestran las fotografías que se muestran a continuación donde se puede observar imágenes de diferentes etapas del proceso de espermatogénesis humana. Por un lado, se puede apreciar las primeras etapas de la espermiogénesis con la presencia de espermátidas inmaduras (Fig.R-4) donde se aprecia un núcleo redondo cuya membrana nuclear está en contacto con el acrosoma en formación. Y tal como se describió en la introducción, el AG se encuentra localizado próximo al núcleo y al acrosoma en formación ya que esta involucrado en este proceso.

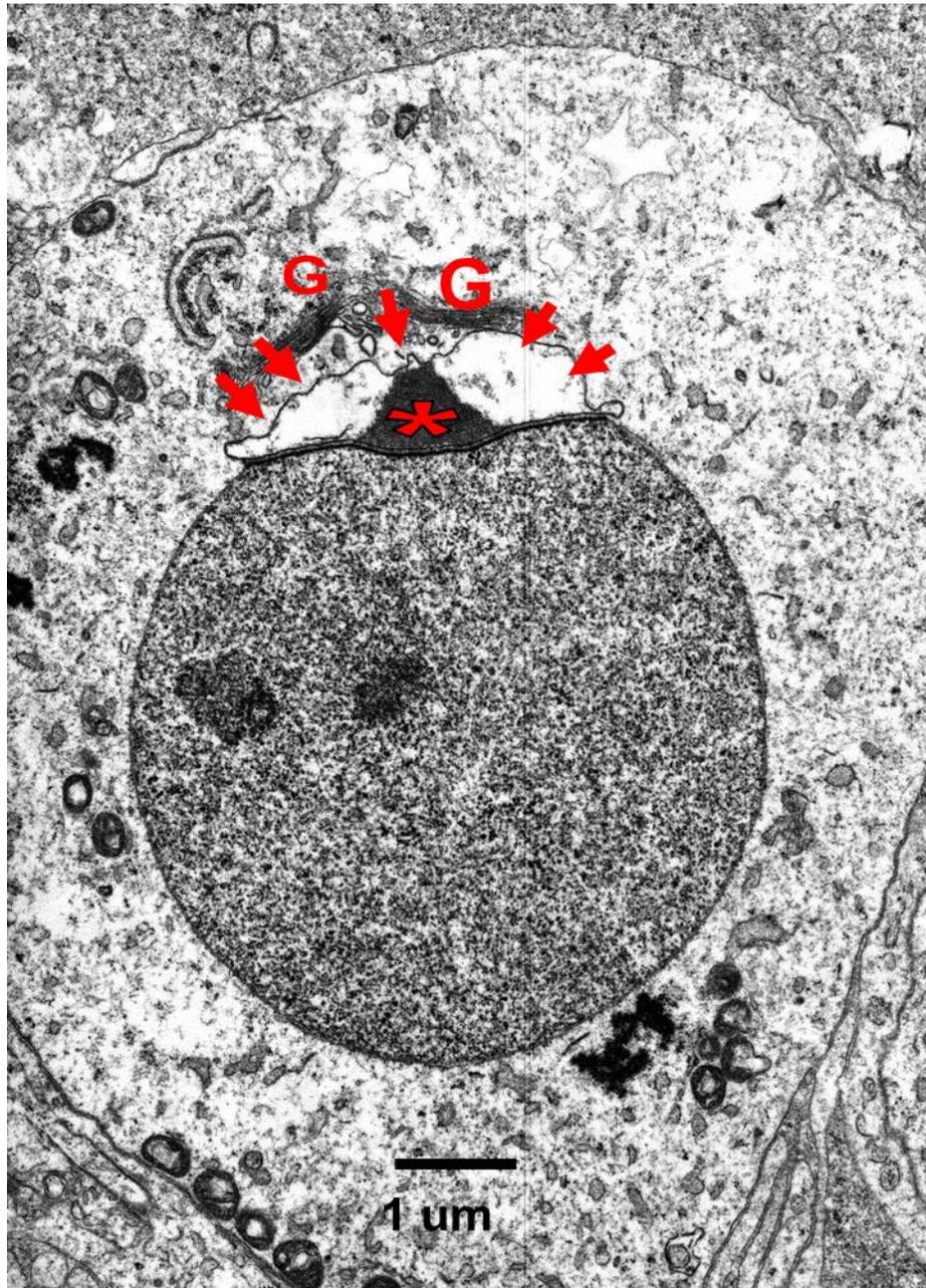


Fig.R-4: Micrografía electrónica donde se observa una espermátida en fase temprana de formación del capuchón acrosómico (flechas) mostrando en su interior el gránulo acrosómico (asterisco) y el aparato de Golgi próximo (G) a el núcleo.

A medida que la espermiogénesis progresa, las cabezas y los núcleos de las espermátidas se van elongando y el material genético empieza a condensarse. También tiene lugar la formación del *manchette*, estructura de MTs que podría estar involucrada en los procesos de elongación de la cabeza del espermatozoide (Fig.R-5).

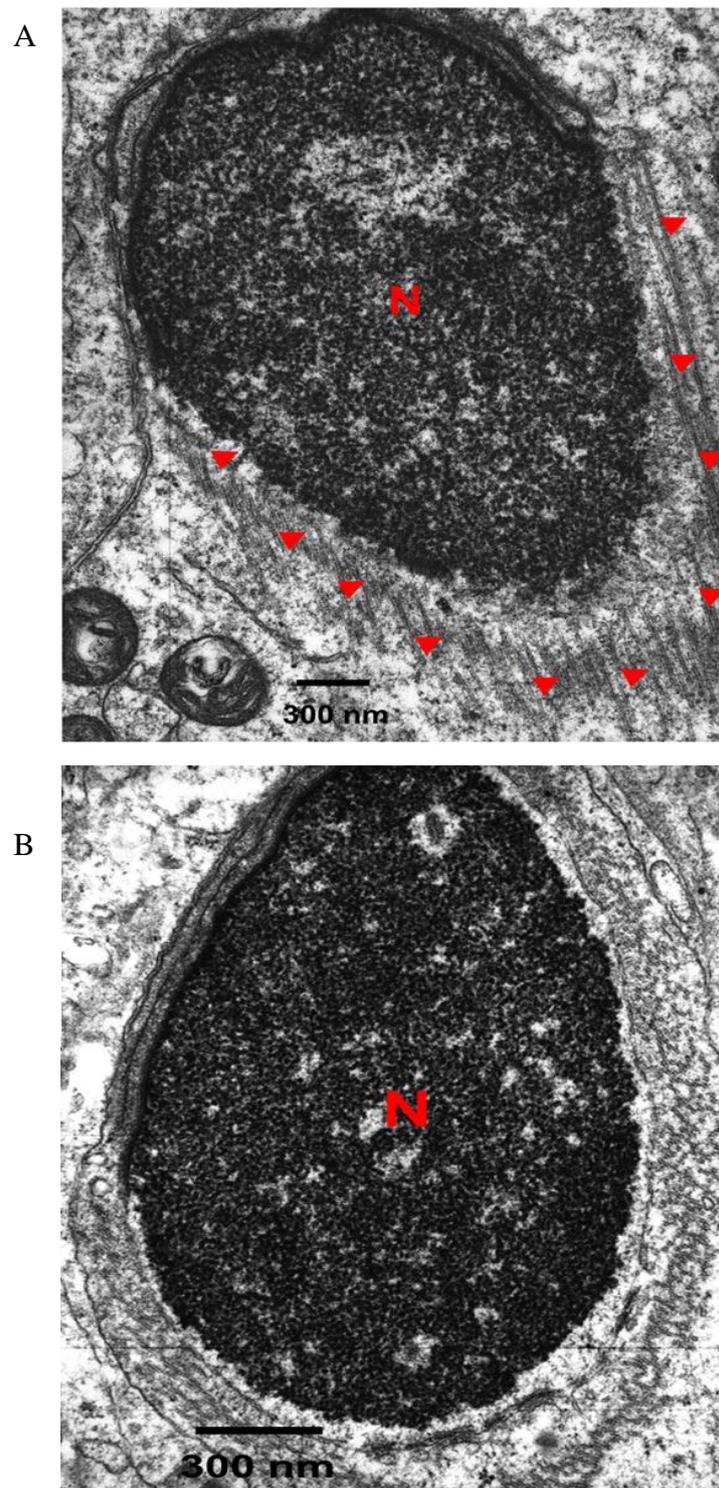


Fig.R-5: A y B. Micrografías electrónicas de secciones oblicuas de espermatidas alargadas en las que se observa una progresiva condensación del material nuclear así como la agrupación de MTs constituyendo el “manchette” (cabezas de flecha) dispuestos en posición caudal con respecto al acrosoma.

Y por último en la figura R-6, se puede observar un espermatozoide maduro con la cabeza elongada y el acrosoma totalmente desarrollado y dispuesto en forma de capuchón alrededor de la parte apical del núcleo de esta célula. En la región caudal del núcleo, aparece el proximal, a partir del cual se originará parte del centrosoma que dará origen al huso mitótico que dirigirá de la primera división del embrión.

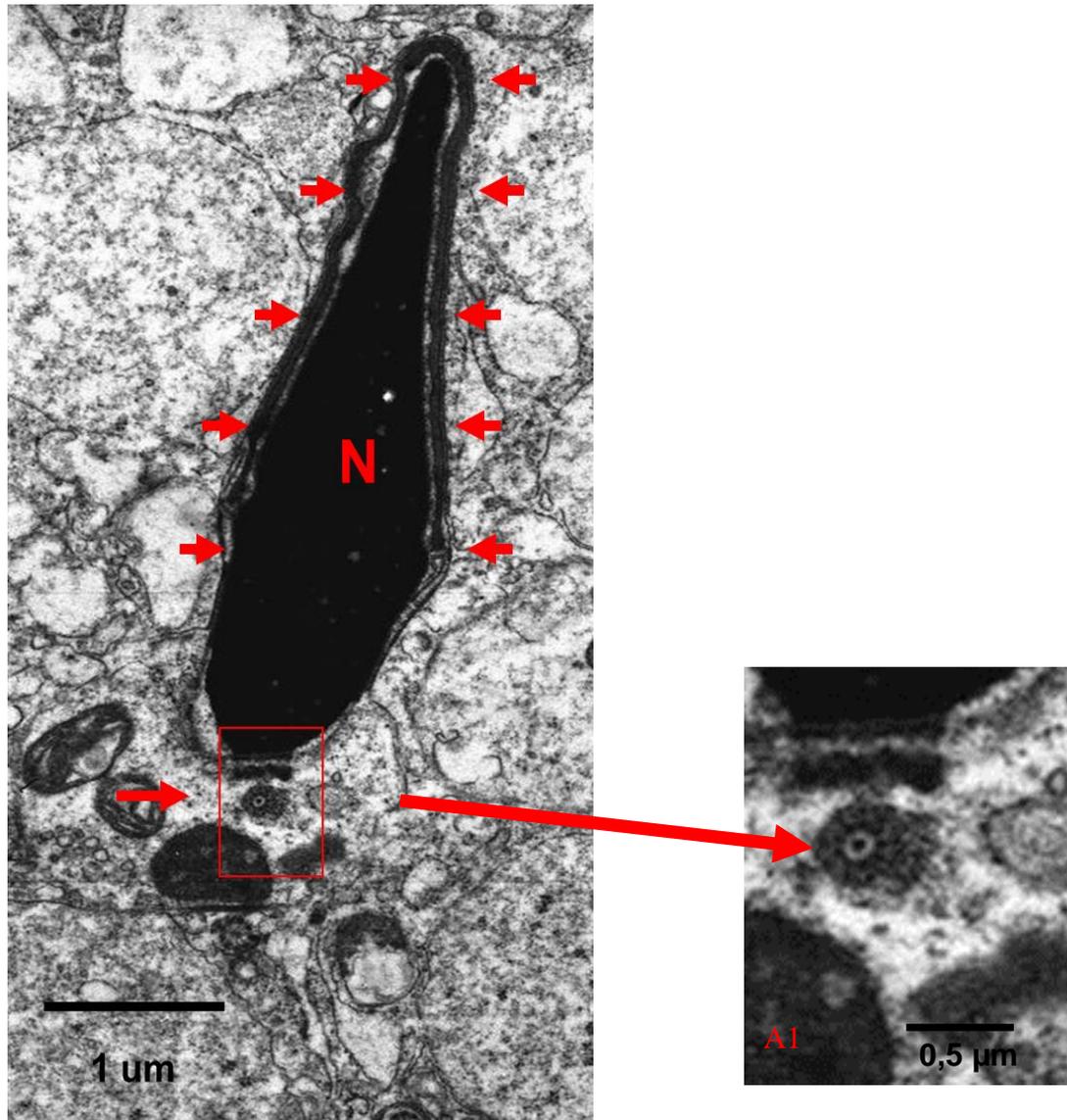


Fig.R-6.: Micrografía electrónica donde se observa una sección perteneciente a la cabeza de un espermatozoide maduro en el que se aprecia una hipercondensación del material nuclear, el acrosoma totalmente desarrollado y el proximal en la región caudal del núcleo (A1).

VI.2.2 Técnicas de Inmumomicroscopía electrónica

Una vez comprobado que el tejido testicular estaba en perfectas condiciones, se realizaron técnicas de inmumomicroscopía utilizando como anticuerpo primario anti TBCD y como secundario un anticuerpo conjugado con oro coloidal y se observa la presencia de TBCD en la zona del centrosoma siendo mayor su concentración en el distal que en el proximal (Fig.R-7).

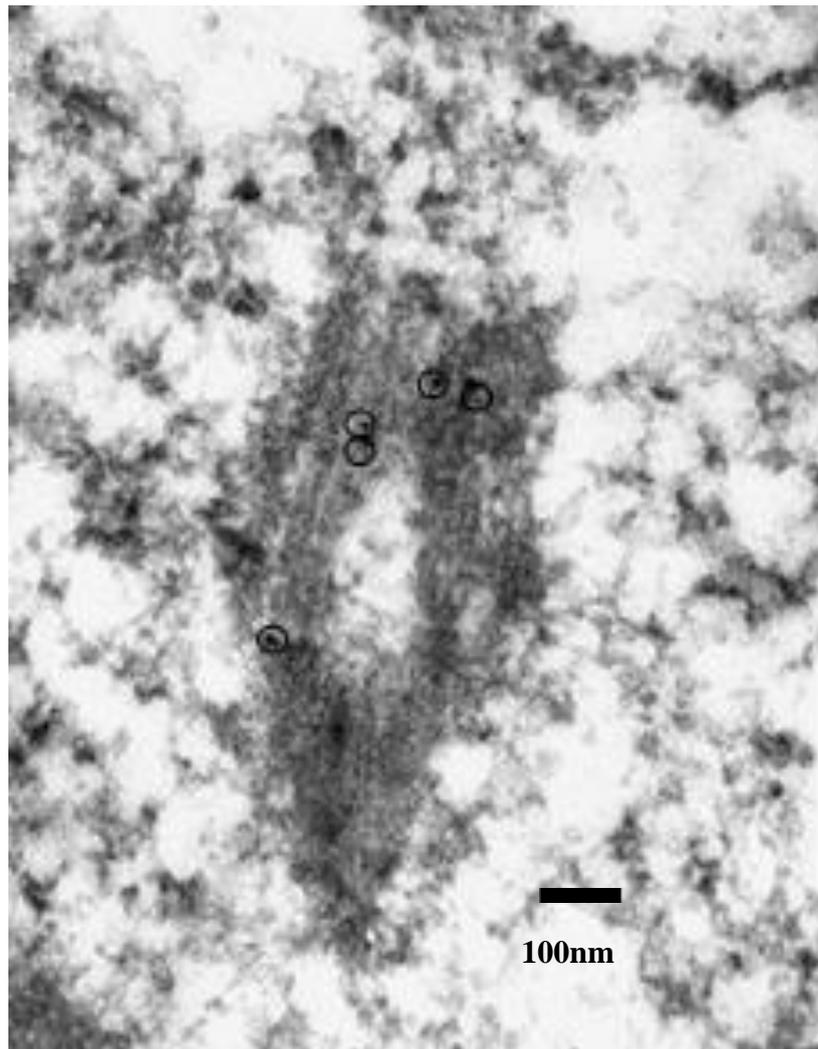


Fig.R-7: Análisis mediante inmuno electrónica de la presencia de TBCD en tejido testicular en una espermátida durante el proceso de espermiogénesis. Los círculos representan las zonas donde se detectó la presencia de las partículas de oro coloidal en el centriolo.

En el caso de TBCE, el estudio que realizamos en tejido testicular humano no aportó resultados, nos gustaría añadir que los experimentos realizados (tesis Carranza, 2010) con testículos de ratón detectaron la presencia de TBCE asociado a los dobletes periféricos en el axonema flagelar y parece lógico pensar que en humanos podría ocurrir algo similar (Fig.R-8).

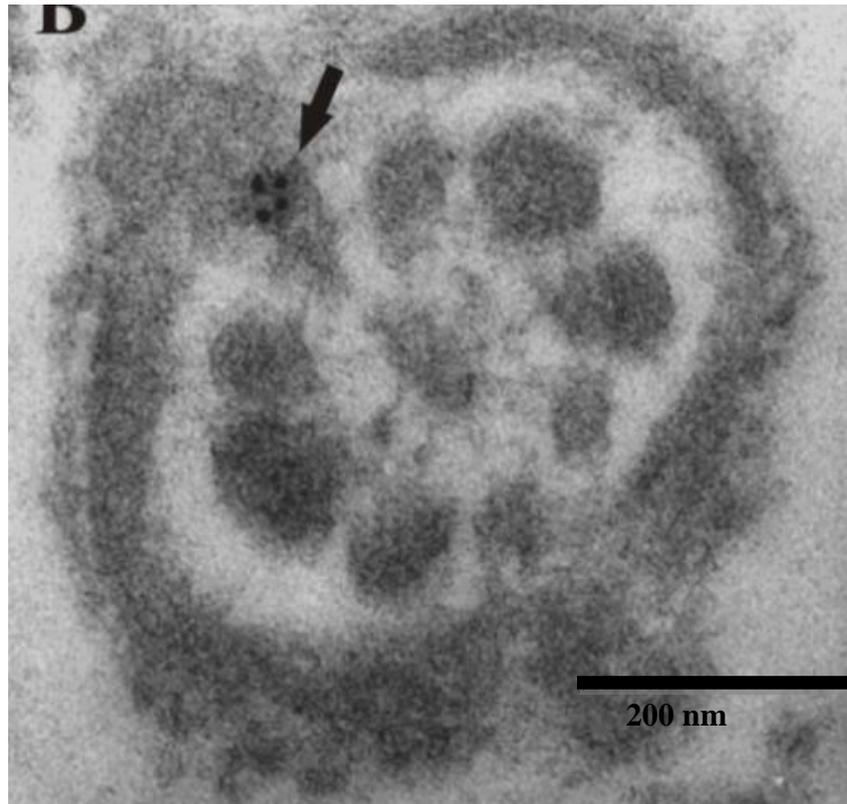


Fig.R-8: Análisis mediante inmunoelectrónica de la presencia de TBCE en tejido testicular de ratón. Sección transversal del flagelo de un espermatozoide (40.000X) donde se detecta la presencia de TBCE (flecha) en los dobletes de MTs periféricos del axonema del flagelo. (Imagen perteneciente a la Tesis de Carranza, 2010).

VI.3 Localización de los TBCs mediante inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal:

Una vez demostrada la presencia de TBCD y TBCE mediante técnicas bioquímicas, el siguiente paso fue determinar la localización subcelular de estas proteínas en los espermatozoides de eyaculado y en los ovocitos mediante técnicas de inmunofluorescencia.

VI.3.1 Inmunofluorescencia en espermatozoides

Para realizar este estudio utilizamos espermatozoides capacitados y como anticuerpos primarios un anticuerpo α -tubulina comercial, anticuerpos TBCD y TBCE purificados por afinidad y los fluorocromos Hoeschst para visualizar los núcleos y Mitotraker para visualizar las mitocondrias.

VI.3.1.1 Localización de TBCD mediante inmunofluorescencia:

El análisis mediante microscopía confocal de alta resolución de las muestras de espermatozoides revela que TBCD se localiza en los centriolos y a lo largo del flagelo (Fig.R-9, A y B).

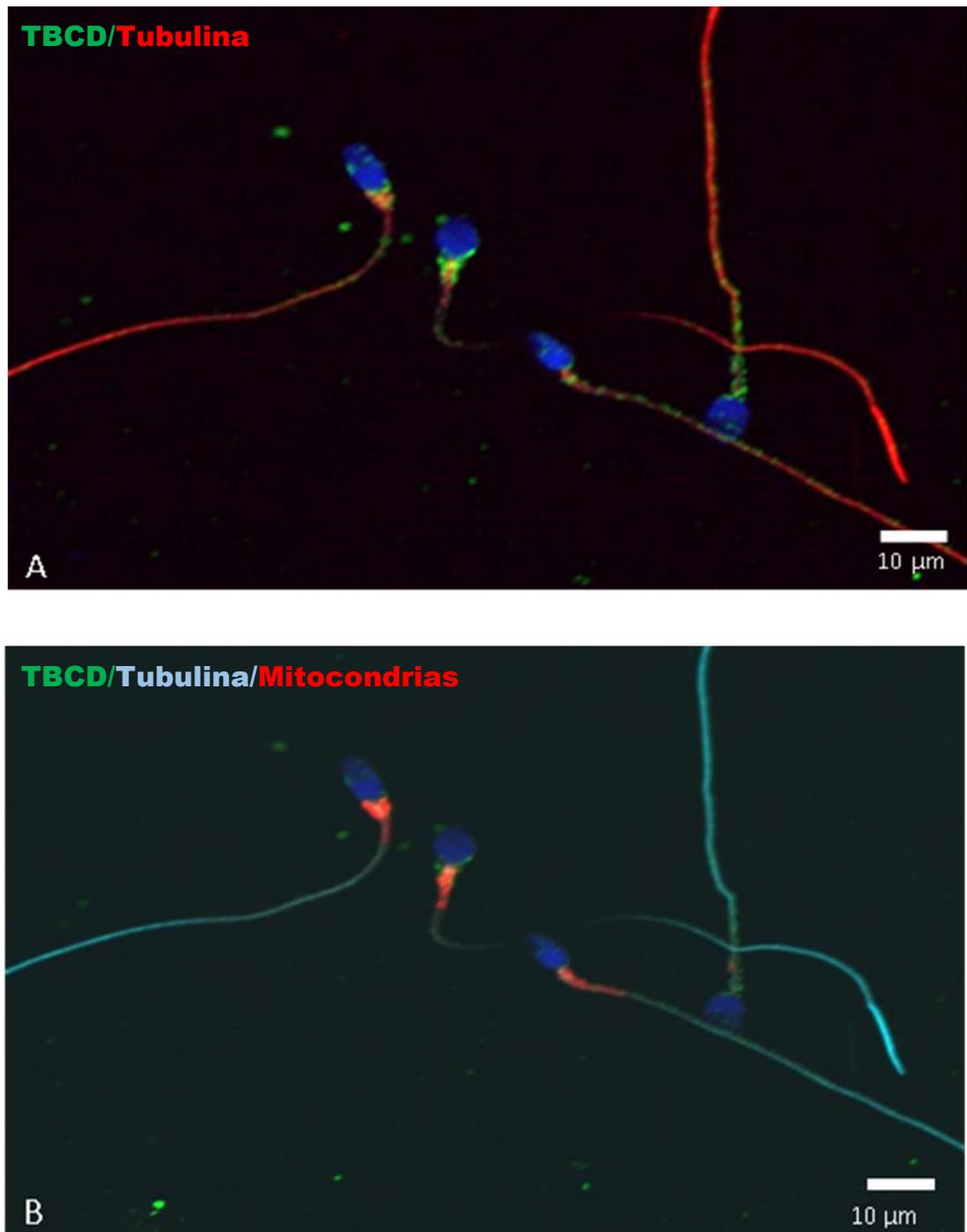


Fig.R-9: Imágenes de microscopía confocal de la misma muestra de espermatozoides humanos pseudo coloreada para facilitar la identificación de las estructuras. A. Detección de TBCD mediante técnicas de inmunofluorescencia donde se han detectado TBCD (canal verde), la α -tubulina (canal rojo) y el ADN (canal azul). Se observa la presencia de TBCD en los centriolos y en el flagelo. B. Se detecta TBCD (canal verde), la α -tubulina (canal cian), mitocondrias con mitotraker (canal rojo) y el ADN (azul). En la pieza intermedia del flagelo se detecta la presencia de mitocondrias.

Mediante inmunocitoquímica y posterior análisis por microscopía confocal de alta resolución se observa que la intensidad de la señal de TBCD es mayor en el centriolo distal indicando que se encuentra más concentrado en este centriolo que en el proximal (Fig.R-10).

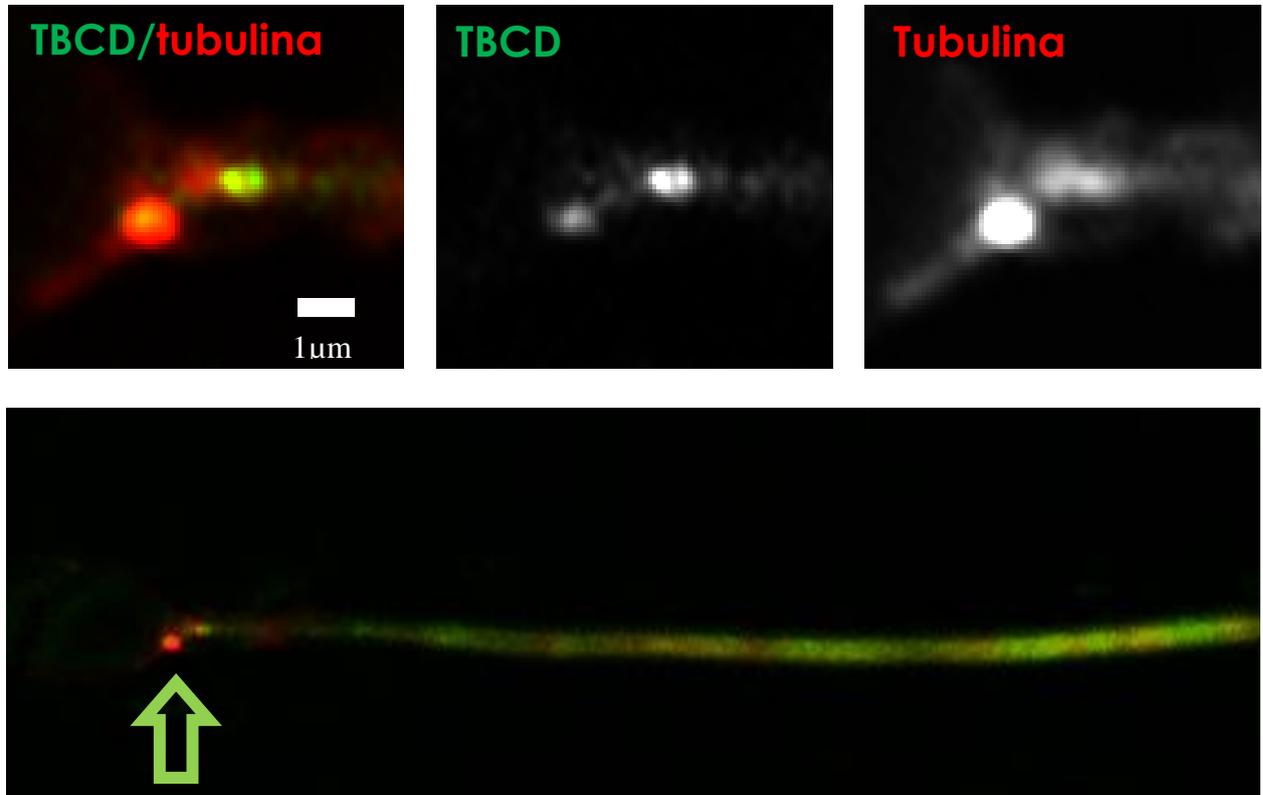


Fig.R-10: Imagen de microscopía confocal detallada de un espermatozoide con ampliación de la zona de localización de los centriolos. Se puede apreciar una mayor intensidad en la señal de TBCD en el centriolo distal.

VI.3.1.2 Localización de TBCE mediante inmunofluorescencia:

Al igual que con TBCD, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia con TBCE y al realizar el estudio de la localización subcelular de TBCE mediante Microscopia Confocal, se observó que TBCE se sitúa en la pieza intermedia del flagelo (Fig.R-11A) rica en mitocondrias. Cuando se utilizó la sonda mitotraker para localizar las mitocondrias, se comprobó que a pesar de que tanto las mitocondrias con TBCE se encontraban localizadas en la pieza intermedia del flagelo, no colocalizaban entre sí (Fig.R-11B).

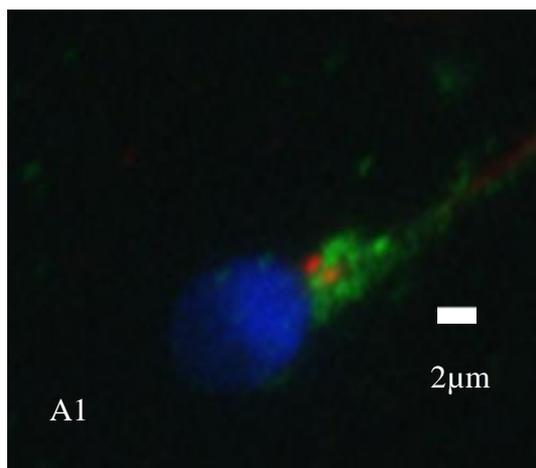
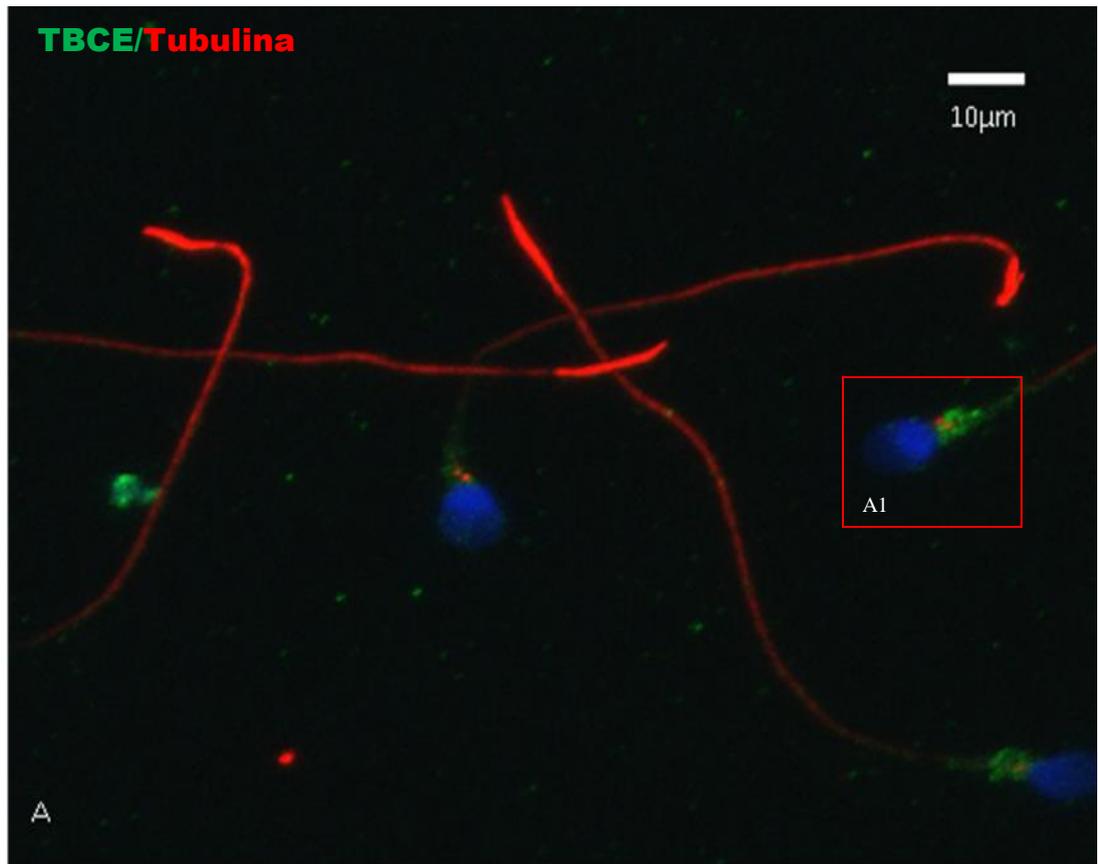


Fig.R-11: Imágenes de microscopía confocal de espermatozoides humanos. A. Detección TBCE (canal verde), la α -tubulina (canal rojo) y el ADN (canal azul). Se observa la presencia de TBCE en la pieza intermedia del flagelo. A1. Ampliación de la cabeza y pieza intermedia de un espermatozoide donde se distinguen los dos centriolos (canal rojo) en la pieza de conexión entre la cabeza y el flagelo y TBCE en la pieza intermedia.

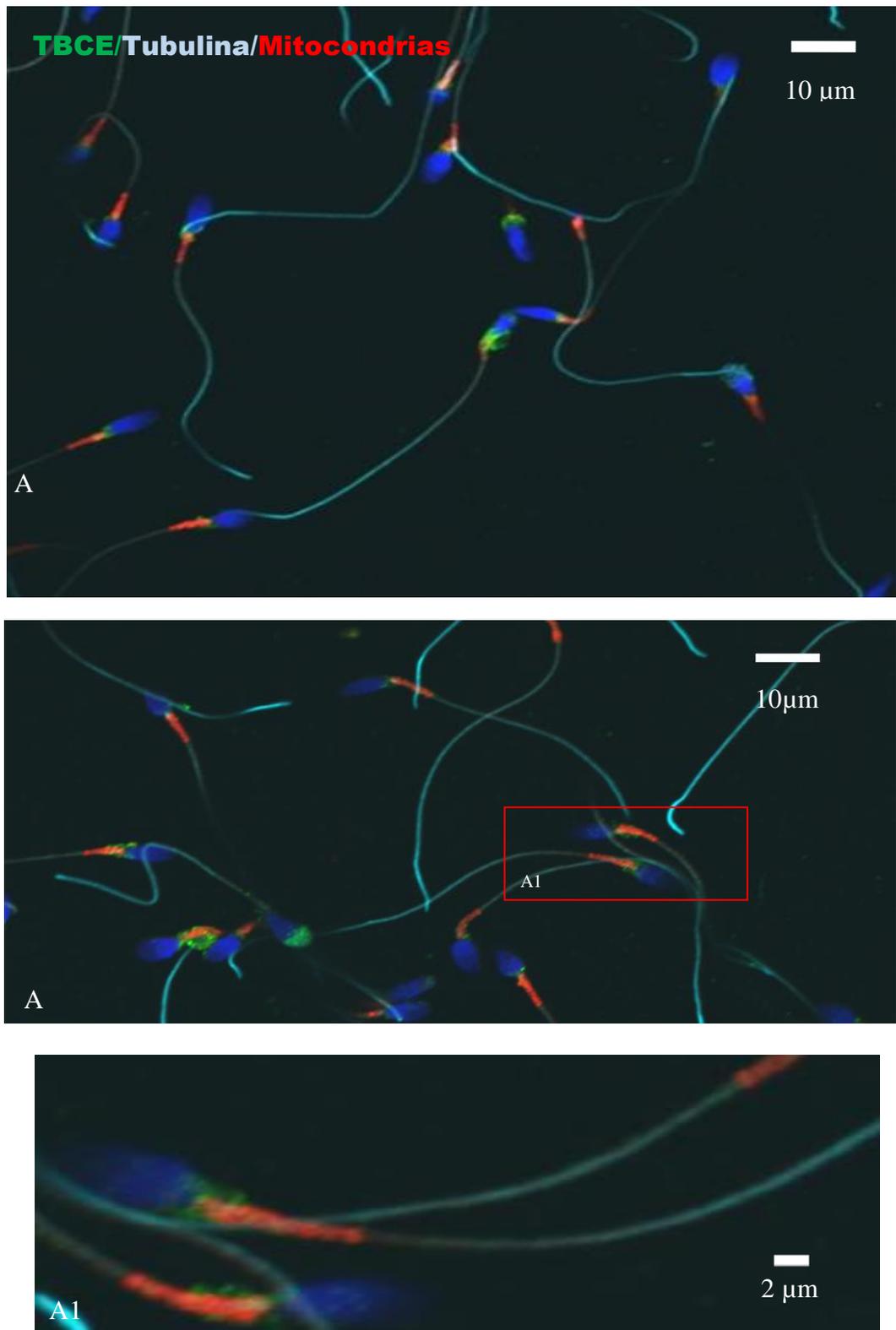


Fig.R-12: Imágenes de microscopía confocal de espermatozoides humanos. A. Se observa la presencia de TBCE (canal verde), la α -tubulina (canal cian), mitocondrias (canal rojo) y el ADN (canal azul). A1. Imagen ampliada donde se observa la presencia conjunta de las mitocondrias y TBCE en la pieza intermedia del flagelo donde se aprecia que no colocalizan.

VI.3.2 Inmunofluorescencia en ovocitos

Al igual que con los espermatozoides, una vez demostrada la presencia de TBCD y TBCE mediante técnicas bioquímicas, estudiamos la localización subcelular de estas proteínas en los ovocitos y para ello llevamos a cabo técnicas de inmunofluorescencia con los mismos anticuerpos y con ovocitos en diferentes estadios de maduración con el propósito de observar si existían diferencias en la localización de TBCD y TBCE a lo largo de las diferentes fases de la meiosis.

VI.3.2.1 Localización de TBCD mediante inmunofluorescencia:

VI.3.2.1.1 Localización de TBCD en PI:

En las inmunofluorescencias realizadas para determinar la localización subcelular de TBCD en ovocitos en el estadio de PI (Fig.R-13) se utilizó un anticuerpo secundario de conejo unido a Alexa 488 (verde) que detecta la presencia de TBCD en forma de cúmulos o gránulos en el citoplasma con una distribución aleatoria aunque muestran una cierta tendencia a localizarse próximos a la membrana nuclear. La VG es fácilmente reconocible ya que el ADN unido al fluorocromo Hoestch emite señal en el canal azul percibiéndose la disposición característica en forma de red de anclaje que tiene el material genético dentro de esta estructura (Fig.R-13.A1).

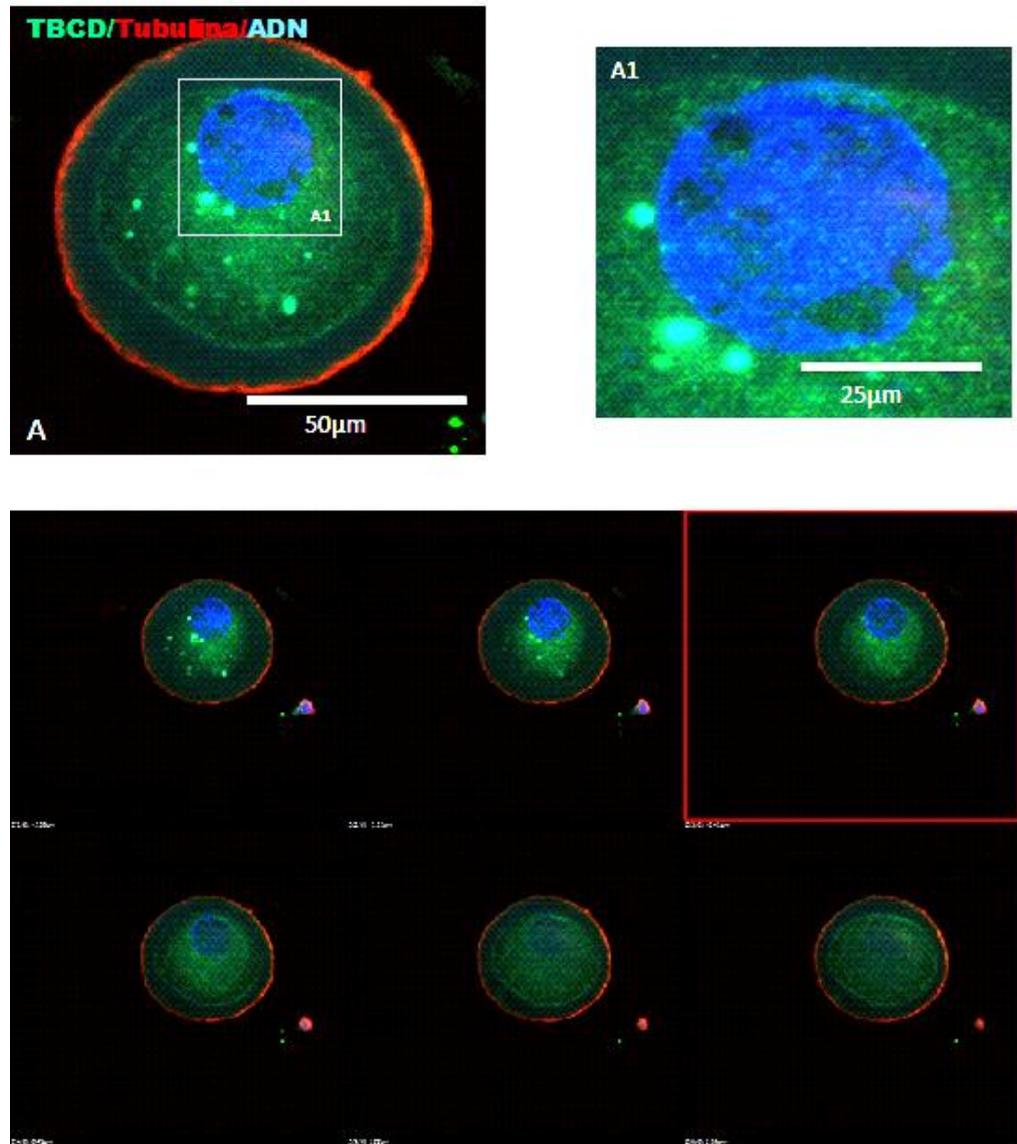


Fig.R-13: Imágenes de microscopía confocal de cortes de planos Z en ovocitos humanos en VG. A. Detección de TBCD (canal verde), la α -tubulina (canal rojo) y el ADN (canal azul) donde se observa la presencia de cúmulos de TBDC en el citoplasma y con una cierta tendencia a localizarse próximos a la VG (Ampliación A1). B. Serie de imágenes de diferentes planos Z del mismo ovocito donde se aprecia la presencia de los gránulos de TBCD en el mismo plano que la VG.

VI.3.2.1.2 Localización de TBCD en MI:

El siguiente paso fue valorar la presencia de TBCD en el siguiente estadio de meiosis, MI, y al igual que en los PI, TBCD se localiza en el citoplasma con una distribución aleatoria formando cúmulos de mayor tamaño a los observados en los PI. En los MI, al igual que en los PI, se observa una cierta tendencia de los gránulos de TBCD a localizarse próximos al material genético. (Fig.R-14).

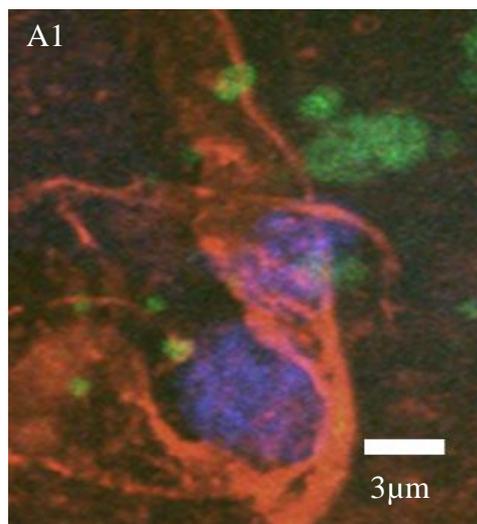
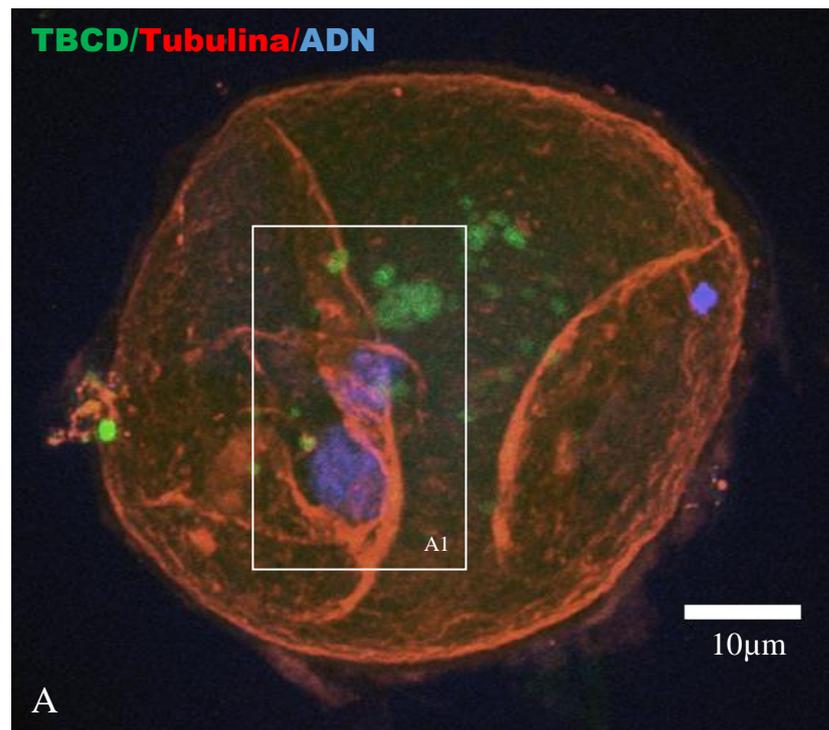


Fig.R-14: Imágenes de microscopía confocal de planos Z ovocitos humanos en MI. Detección de TBCD (canal verde), la α -tubulina (canal rojo) y cromosomas (canal azul) donde se observa la presencia de cúmulos de TBCD en el citoplasma y su tendencia a ubicarse en localizaciones cercanas al material genético (detalle ampliado A1).

3.2.1.3 Localización de TBCD en MII:

Por último, se valoró la localización subcelular de TBCD en ovocitos en MII.

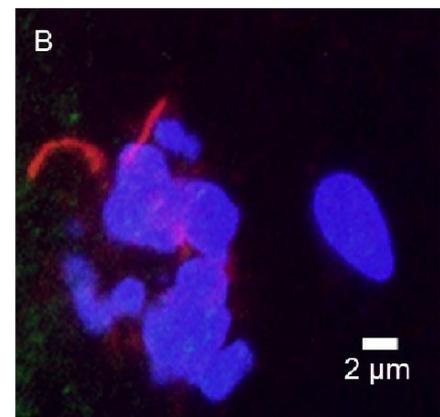
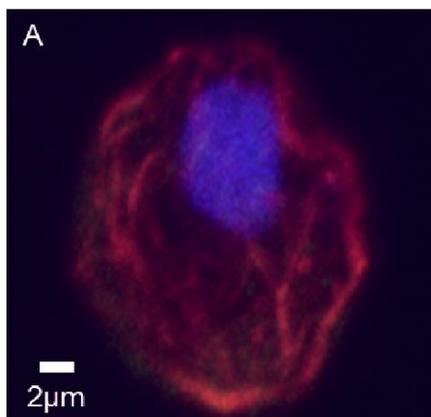
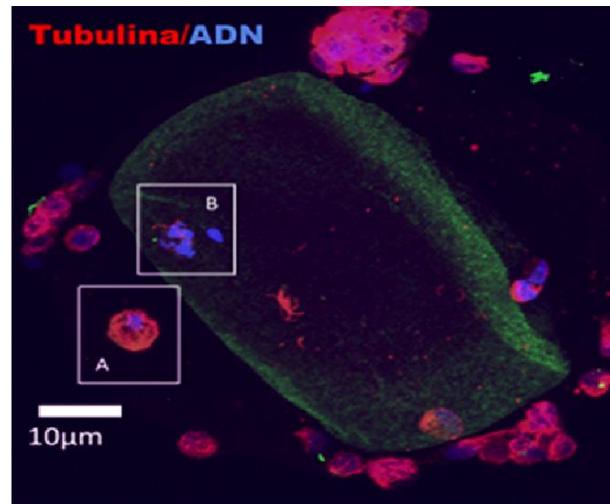


Fig.R-15: Imágenes de microscopía confocal de planos Z de ovocito humanos en MII donde se observa por un lado los cromosomas dispuestos en el huso y por otro el CP. A. Imagen detallada del CP donde se encuentra parte del material genético sobrante (canal azul) que tiene que eliminar el ovocito para convertirse en una célula haploide y algo de citoplasma. B. Imagen detallada de los cromosomas del ovocito donde se puede apreciar la presencia de alguno de los MTs (α -tubulina, canal rojo) que forman parte del huso meiótico.

Al realizar el análisis mediante microscopía confocal de alta resolución, se observa que al igual que con los estadios de maduración anteriormente estudiados, TBCD se localiza en el citoplasma de los ovocitos detectándose una mayor presencia de este cofactor en las zonas próximas o incluso en contacto con los cromosomas que se deberían de encontrar unidos al huso meiótico aunque este no se aprecie en las fotos (Fig.R-16.1).

También se observan diferencias en la forma o consistencia, tamaño y distribución de TBCD entre diferentes ovocitos en MII. En la imagen A de la figura R-16.1A, se observa una agrupación más compacta y densa mientras que en la imagen R-16.1B forma acúmulos algo más grandes que se localizan rodeando el ADN.

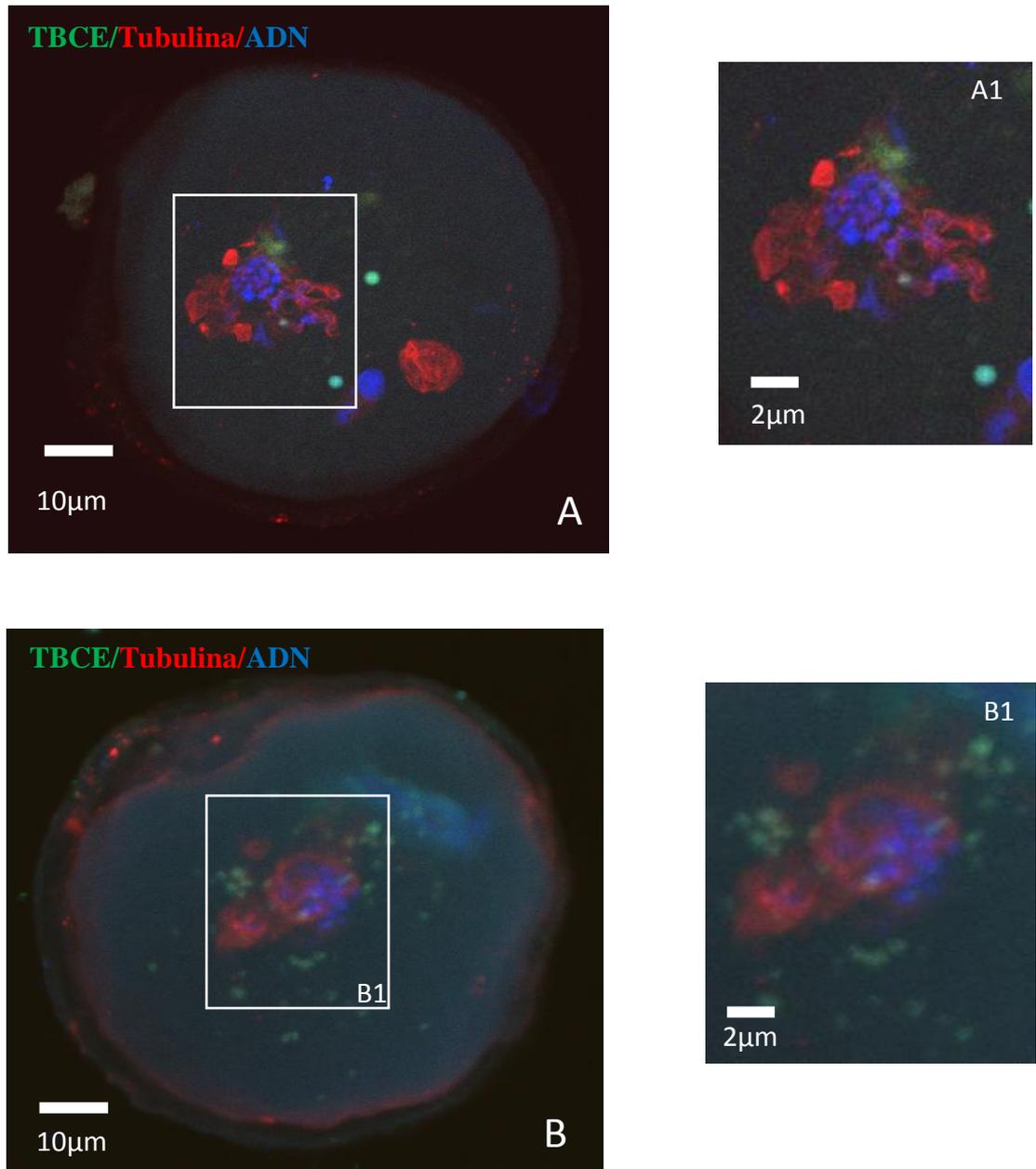


Fig.R-16.1: Imágenes de microscopía confocal de planos Z de ovocitos humanos en MII. Detección de TBCD (canal verde), la α -tubulina (canal rojo) y cromosomas (canal azul) donde se observa la presencia de cúmulos de TBCD de diferente tamaño y consistencia en el citoplasma y en contacto con los cromosomas (Ampliación B1 y C1). También se detecta la presencia de tubulina en contacto con el material genético.

VI.3.2.2 Localización de TBCE mediante inmunofluorescencia:

VI.3.2.2.1 . Localización de TBCE en PI:

Tal y como se hizo con TBCD, la localización subcelular de TBCE también fue valorada con técnicas de inmunofluorescencia y análisis mediante microscopía confocal iniciándose el estudio en los ovocitos más inmaduros es decir en los PI, donde se detecta la presencia de TBCE en forma de cúmulos o gránulos distribuidos por el citoplasma.

Al igual que se observa con TBCD, la forma y distribución de los cúmulos de TBCE muestran cambios de unos PI a otros (Fig.R-17.1 y 17.2) ya que ambos ovocitos a pesar de ser PI están en diferentes estadios de maduración dentro de la misma fase de la meiosis ya que se observan diferencias en la consistencia y forma del ADN dentro de la VG. En la Fig.R-17.1 se observa que el ADN de la VG se dispone en forma de red mientras que el ADN del PI de la Fig.R-17.2 está empezando a condensarse y por lo tanto se trata de una fase madurativa mas avanzada que la del ovocito de la Fig.17.1.

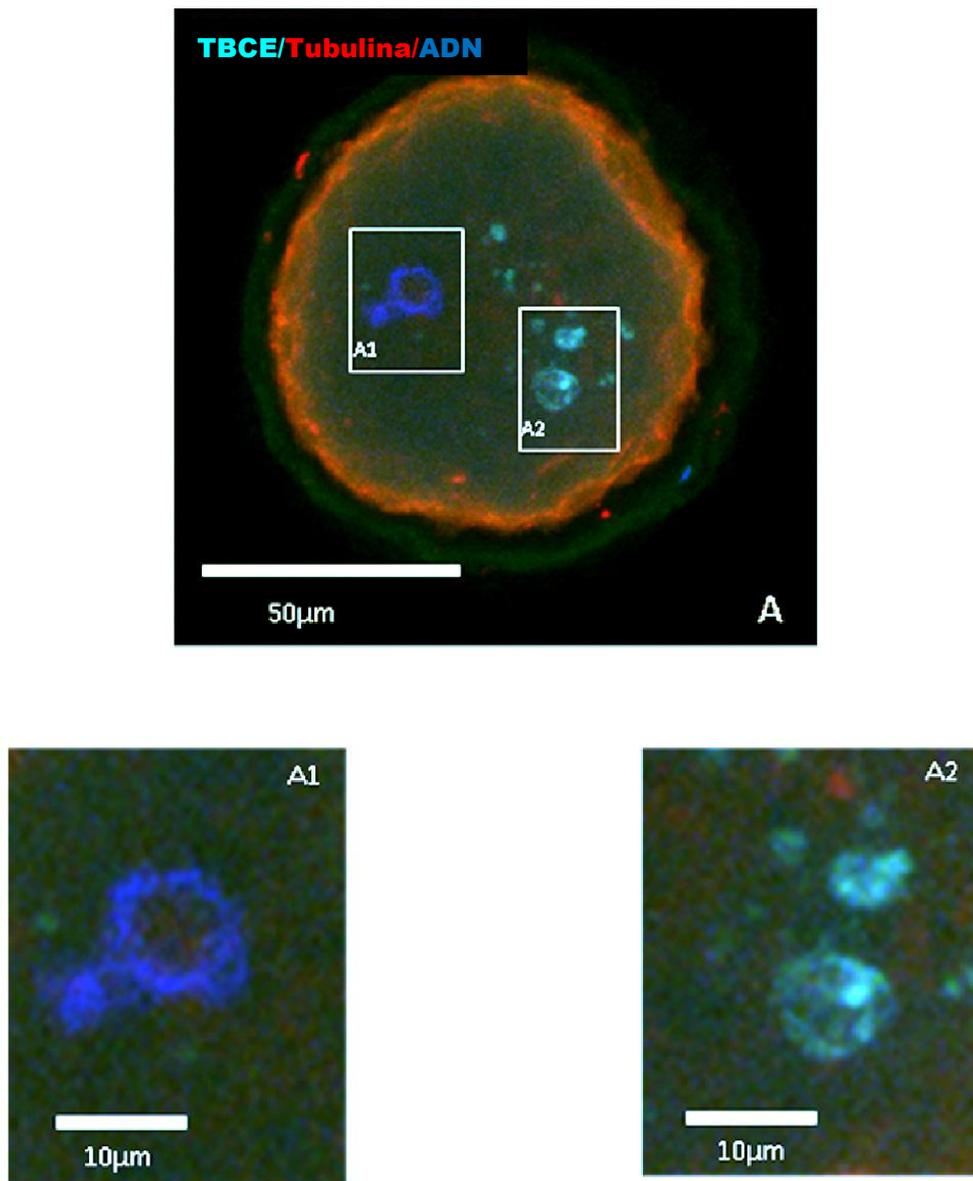


Fig.R-17.1: Imágenes de microscopía confocal de planos Z de ovocitos humanos en PI. Detección de TBCE (canal verde), la α -tubulina (canal rojo) y el ADN (canal azul) donde se observa la presencia TBCE. A. Ovocito en PI donde el ADN de la VG se dispone en forma de red (Ampliación A1) y TBCE se encuentra formado una especie de cúmulos o nubes (Ampliación A2).

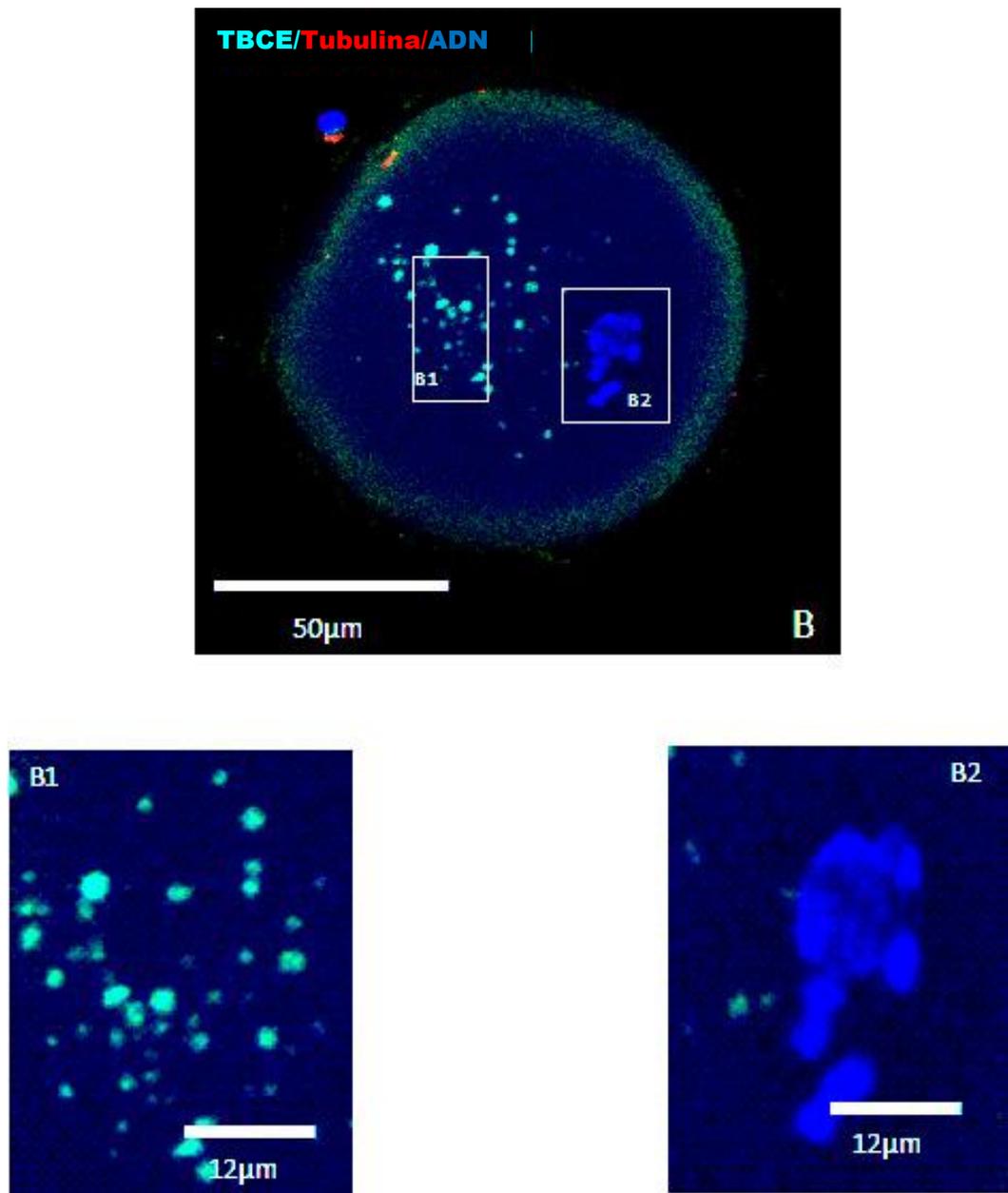


Fig.R-17.2: Imágenes de microscopía confocal de planos Z de ovocitos humanos en PI. Detección de TBCE (canal verde), la α -tubulina (canal rojo) y el ADN (canal azul) donde se observa la presencia TBCE. B. Ovocito en PI donde TBCE se detecta en forma de un número elevado de gránulos de menor tamaño que los cúmulos que presentaba el ovocito de la imagen R-20.1 (Ampliación B1) y el material genético está empezando a condensarse (Ampliación B2). A diferencia de TBCD, los cúmulos de TBCE no se localizaban próximos la VG.

VI.3.2.2.2 Localización de TBCE en MI:

El siguiente paso de la meiosis es donde se realizó la valoración de la presencia de TBCE fue en ovocitos en MI. Y al igual que en las PI, TBCE se encuentra formando cúmulos dentro del citoplasma y no muestran ningún patrón de distribución determinado (Fig.R-18) y al contrario que ocurre con TBCD estos no se localizan próximos al material genético.

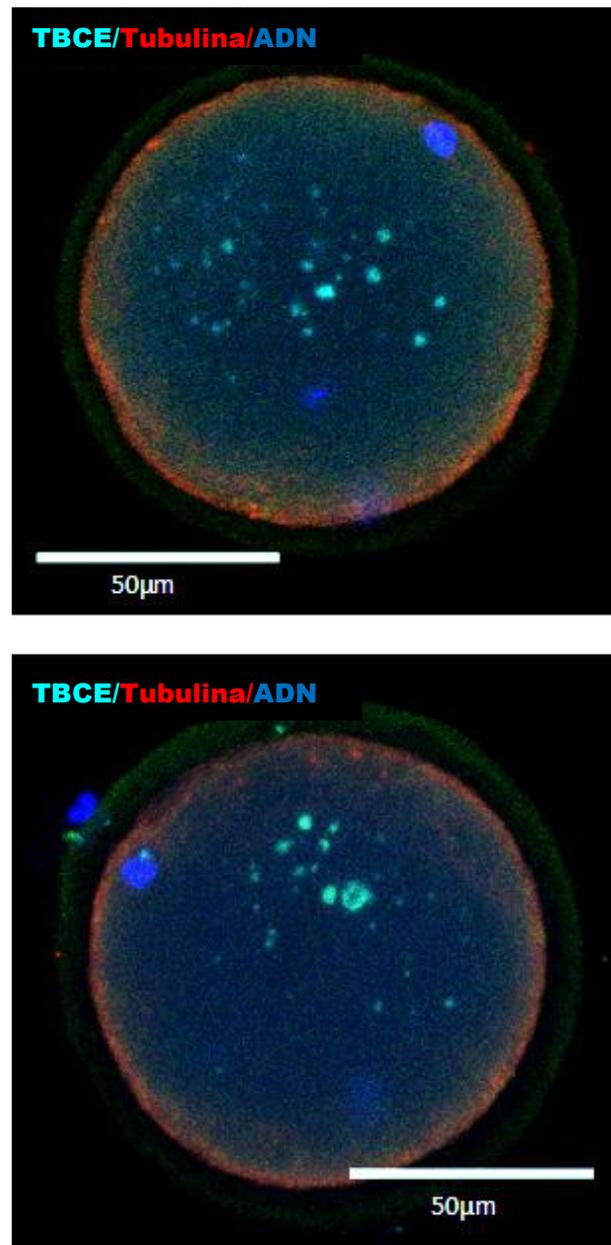


Fig.R-18: Imágenes de microscopía confocal de planos Z de ovocitos humanos en MI. Detección de TBCE (canal verde), la α -tubulina (canal rojo) y cromosomas (canal azul) donde se observa la presencia TBCE en el citoplasma.

VI.3.2.2.3 Localización de TBCE en MII:

Por último, se valoró la localización subcelular de TBCE en ovocitos en MII donde al igual que en los estadios anteriores, PI y MI se encuentra localizado en forma de gránulos distribuidos por el citoplasma.

La distribución de los cúmulos de TBCE presenta cambios de unos MII a otros (Fig.R-19), tal y como se observa con TBCD y TBCE en otros estadios madurativos ya que los ovocitos podrían haber estado en diferentes fases dentro de la etapa de MII.

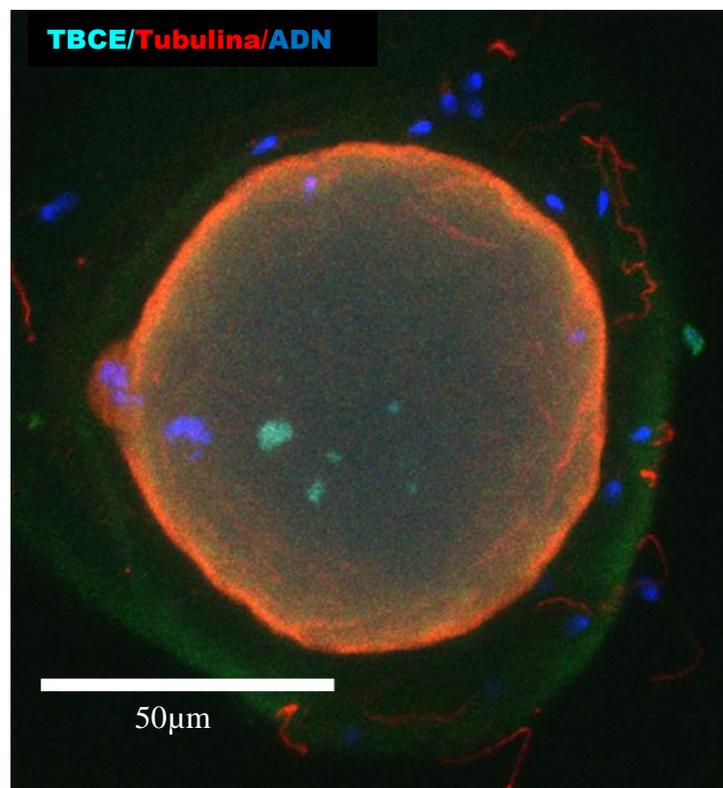


Fig.R-19.1: Imágenes de microscopía confocal de planos Z de ovocitos humanos en MII. Inmunofluorescencia de TBCE (canal verde), la α -tubulina (canal rojo) y cromosomas (canal azul). TBCE se detecta en el citoplasma. Unido a la ZP se puede observar las cabezas (azul) y los flagelos (α -tubulina, canal rojo) de los espermatozoides que ha intentado fecundar al ovocito sin éxito. También se puede ver en esta imagen la presencia del CP donde hay parte del exceso de material genético que el ovocito tiene que eliminar para convertirse en una célula haploide

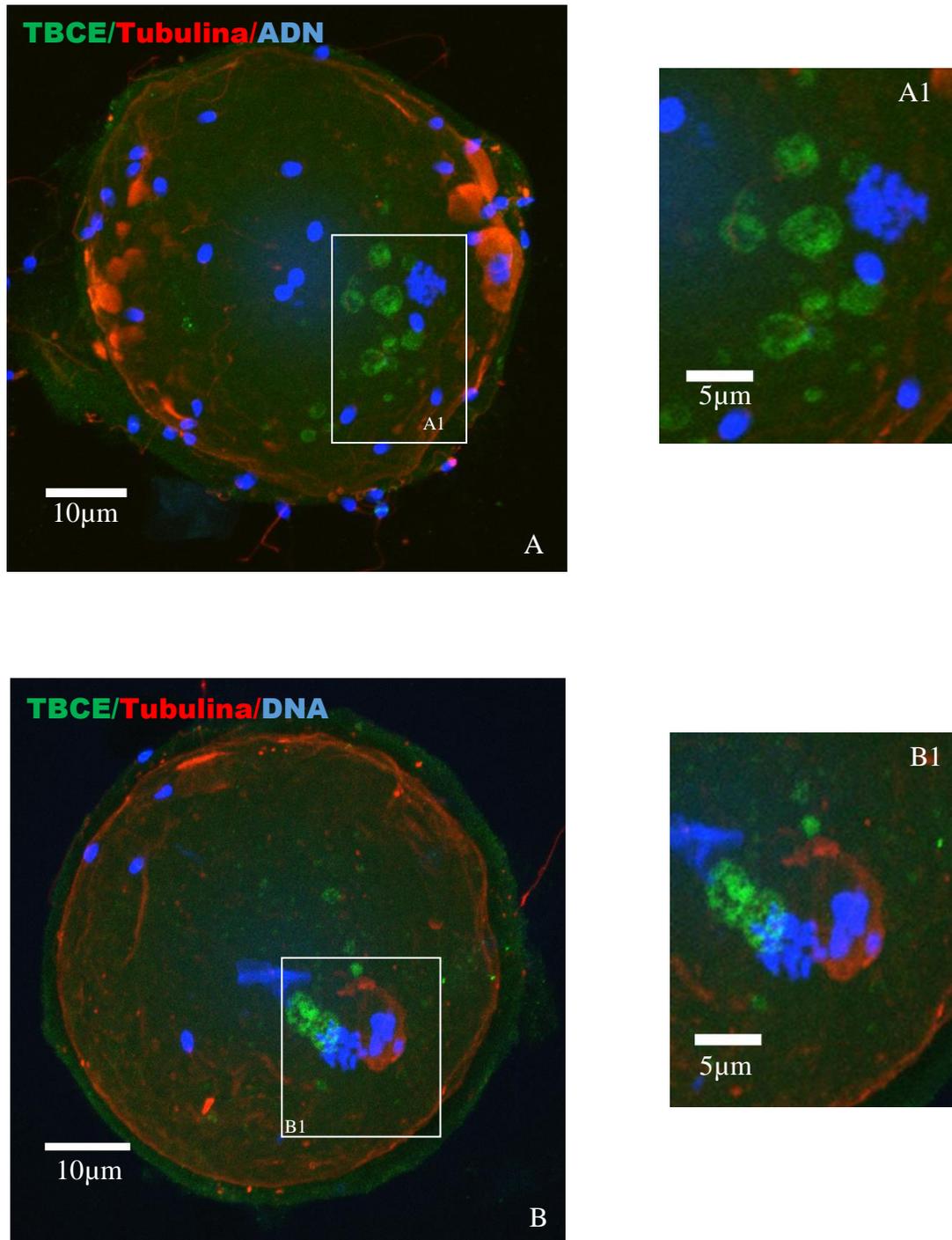


Fig.R-19.2: Imágenes de microscopía confocal de planos Z de ovocitos humanos en MII. Inmunofluorescencia de TBCE (canal verde), la α -tubulina (canal rojo) y cromosomas (canal azul). Tanto en la imagen A como en la B, se detecta la presencia de TBCE en contacto con los cromosomas (A1 y B1).

También hemos detectado la presencia de TBCE, en ovocitos que han iniciado los mecanismos de fecundación pero no han sido capaces de finalizar el proceso ya que a las 18 horas postpunción no presentaron los 2PN2CPs (dos pronúcleos y dos corpúsculos polares) (Fig.R-20).

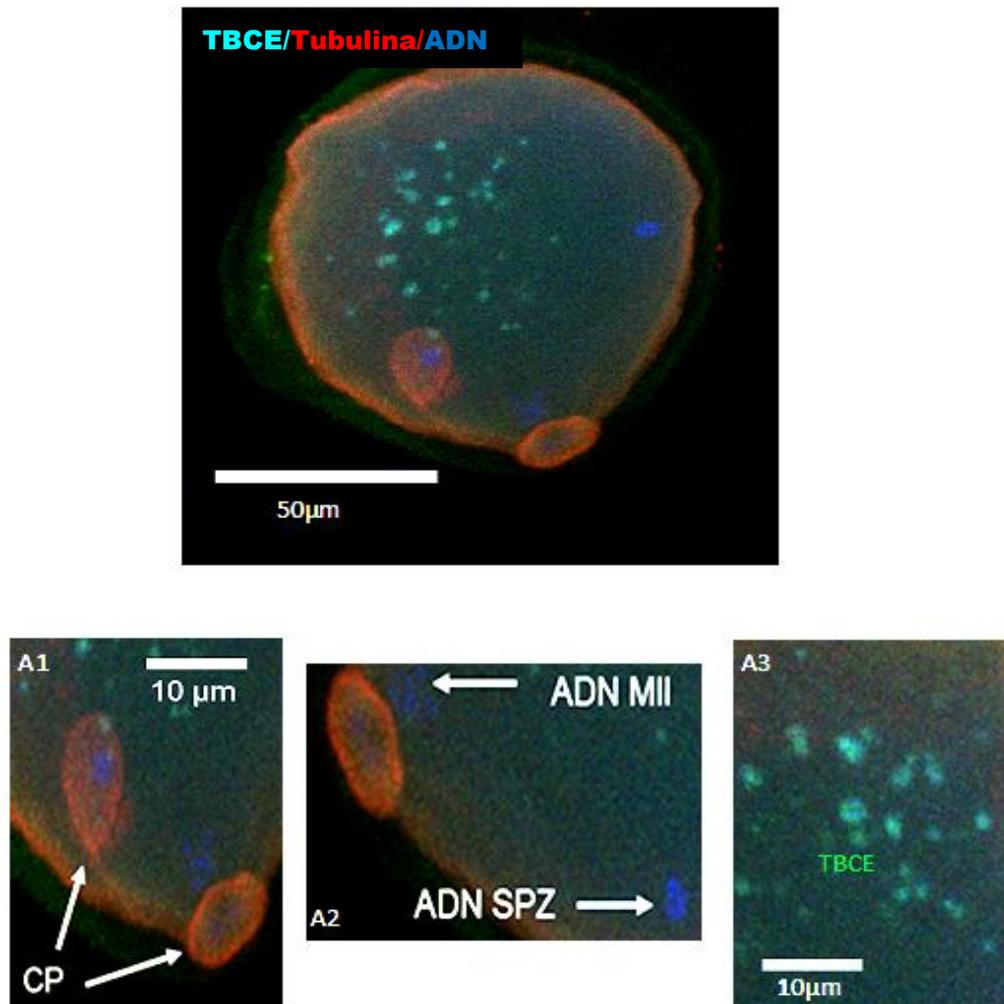


Fig.R-20: Imágenes de microscopía confocal de planos Z en un MII microinyectado y que no ha completado el proceso de fecundación. En este ovocito ha tenido lugar los primeros mecanismos de activación del ovocito cuando tiene lugar la fecundación. Por un lado el MII ha reanudado la división meiótica ya que se detectan los dos CP (A1). Dentro del ovocito se observan dos grupos de ADN (A2), probablemente uno corresponde al ovocito ya que se encuentra próximo a uno de los dos CP y el otro al núcleo del espermatozoides. TBCE (A3) se encuentra formando gránulos que tienden a estar más concentrados en una región del citoplasma no muy próxima al material genético.

VI.4 Evaluación de haplotipos ligados al “Síndrome del enfermo de los cofactores de la tubulina” en pacientes con problemas de fertilidad”:

Este apartado del trabajo formaba parte del estudio del Síndrome del enfermo de los cofactores de la tubulina y realizado en colaboración con el Dr Carlos Valiente Barroso y el Servicio de Psiquiatría del HUMV donde se incluyeron pacientes psiquiátricos con enfermedades relacionadas con alteraciones en el desarrollo neuronal y pacientes con problemas de fertilidad. La finalidad del estudio fue realizar un cribado genético basado en el genotipado de una serie de *tagger* SNPS de los genes que codifican para los TBCs en pacientes con problemas de fertilidad. Para ello y con la ayuda de la lista de *coding* SNPs de los genes de TBCs propuesta por la NCBI en el año 2008 se diseñó un chip de ADN con 33 *coding* SNP y se añadieron 24 *tag* SNPs para poder realizar estudio de haplotipos. El análisis de los resultados de los haplotipos generados fue realizado mediante programas suministrados por el propio CeGen y con ayuda del Dr Pascual Sánchez Juan, experto en epidemiología genética.

Los cambios observados fueron:

- Arl2: rs664226 Val x Ala en 20% pacientes (esquizofrenia y esterilidad)
- TBCB: rs1801989 Pro x Leu, en 1 paciente de esquizofrenia
- TBCC: rs2234025 Ala x Val, en 1 paciente de esquizofrenia
- TBCD: rs2292971, Met x Thr, 1 paciente de esquizofrenia (en homocigosis)
- TBCD: rs11550064, Arg x Ile, 1 paciente de esquizofrenia (en heterocigosis)
- TBCD: rs3785522, Glu x Gly, en 1 paciente de esterilidad
- TBCE: rs16832611, Val x Ala, en 1 paciente de esquizofrenia y en un sano en heterocigosis

De toda la población de pacientes de fertilidad estudiada, sólo una paciente de la URA presenta un cambio en homocigosis en el SNPs RS3785522 del gen que codifica para TBCD. Esta variación consiste en un cambio del aminoácido glutamina por el aminoácido glicina en una de las zonas más conservadas de TBCD. En concreto, en la región distal del extremo C-terminal que comprende una de las dos localizaciones de TBCD que interacciona con los centriolos (Fanarraga y col, 2010).

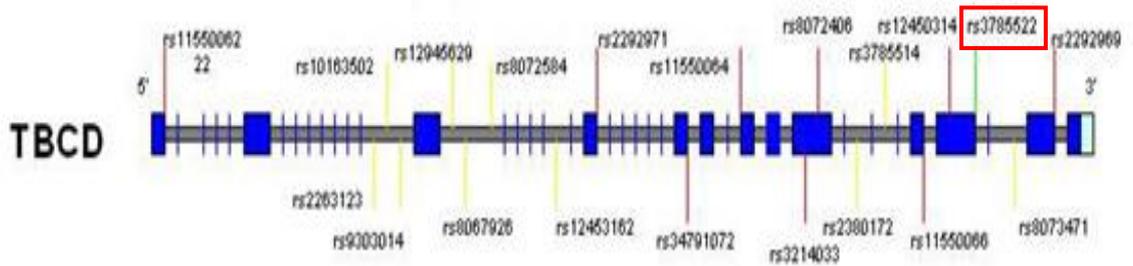


Fig.R-21: Esquema resumen de la ubicación del cambio en el SNPs RS378522 detectado en homocigosis en una paciente de la URA en el mapa del gen de TBCD con la ubicación de los SNPs que seleccionamos para hacer el estudio (tesis Valiente, 2009).

El diagnóstico de la mujer fue de baja respondedora ya que el día de la punción se obtuvieron menos de 5 ovocitos (Barri y col, 1998; Rombauts y col, 1998; Surrey y col, 1998) y el del varón astenozoospermia (movilidad progresiva inferior al 35%). La pareja se sometió a dos ciclos de fecundación *in vitro*. En el primer ciclo se obtuvieron 5 ovocitos maduros y de ellos fecundaron 2 que no pudieron ser transferidos al útero porque no evolucionaron favorablemente. En el segundo ciclo, se obtuvieron 4 ovocitos maduros y fecundaron 2 que fueron transferidos al útero materno dando lugar al nacimiento de un niño sano (46 XY). A pesar de que la pareja consiguió tener un hijo, las tasas de fecundación y de desarrollo embrionario fueron bajas (inferiores a un 50%).

VII DISCUSIÓN

En los procesos de reproducción, los MTs son fundamentales debido a que están implicados en los mecanismos de formación de gametos y embriones. En los gametos, participan en la separación de las cromátidas durante la mitosis/meiosis, la citocinesis, el transporte intracitoplásmico, la formación del *manchette* y en el ensamblaje y mantenimiento de flagelos. Durante el proceso de fecundación intervienen en la aproximación de los pronúcleos y formación del centrosoma del embrión.

Es sabido que en todas las células eucariotas, gametos incluidos, donde hay MTs debería de haber TBCs, ya que están implicados en la biosíntesis y degradación de la tubulina que constituye la unidad funcional de los MTs. Por estos motivos, decidimos realizar el estudio de los TBCs en gametos humanos. Y en concreto, nuestros trabajos se centraron en TBCD y TBCE porque además de participar en el plegamiento y asociación de los polipéptidos recién sintetizados de tubulina, también tienen la capacidad de asociarse al dímero de tubulina y disociarlo, separando los polipéptidos de α - y β - tubulina entre sí, lo cual puede ser importante en la remodelación microtubular.

Durante el estudio aplicamos diferentes técnicas bioquímicas en gametos humanos, células de tejido renal (Hek293T) y células de corteza cerebral humana donde previamente se conocía la existencia y cantidad de estas proteínas para confirmar la presencia de TBCD y TBCE en los ovocitos y espermatozoides de eyaculado demostrando que su concentración es mayor en estos gametos que en células somáticas.

En los espermatozoides, el aumento de la concentración de TBCD y TBCE observadas en nuestro estudio, con respecto a las células somáticas podría deberse a que los espermatozoides poseen un citoesqueleto muy especializado que forma un flagelo (50 μm de longitud) que es responsable de la mayor parte de la envergadura de estas células (60 μm de longitud). Para mantener constante su longitud, el flagelo experimenta continuamente procesos de polimerización y despolimerización de los MTs en el extremo más distal de su axonema y para ello requiere de un aporte continuado de heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina. Por lo tanto es muy probable que necesite de la presencia de niveles elevados de TBCD y TBCE, ya que ambos cofactores están implicados tanto en la asociación como en la disociación de los dímeros de tubulina.

El hecho de que las concentraciones de estos dos TBCs estén elevadas en espermatozoides, nos induce a pensar que es muy probable que algo similar ocurra en

estadios madurativos más tempranos. La formación de espermatozoides a partir de las espermatogonias requiere de cambios dramáticos en la organización de los MTs que implican la aparición de estructuras transitorias como el *manchette* o más estables como el flagelo. Y por la tanto van a precisar de un gran aporte de subunidades de tubulinas y de la participación de TBCD y TBCE así como del resto de los TBCs. Durante el estudio, no se ha confirmado esta hipótesis debido a las dificultades técnicas en la obtención y separación de los diferentes estadios de maduración a partir de tejido testicular humano, pero sí que podemos señalar que los resultados obtenidos con extractos de testículos de ratón apoyan esta idea ya que demuestran que la concentración de estos dos TBCs es elevada (tesis Carranza, 2010 y tesis Bellido, 2006). Y además en el caso de TBCE podemos añadir que alcanza su máxima concentración en el ratón adulto cuando la espermatogénesis está más activa (tesis Carranza, 2010).

La aplicación de técnicas de inmunomicroscopía, nos han permitido detectar la localización subcelular de TBCD y TBCE en espermátidas y espermatozoides de eyaculado y los hallazgos obtenidos apoyan la idea expuesta anteriormente basándonos en los resultados de las pruebas bioquímicas, donde planteamos la necesidad de la presencia de niveles elevados de TBCD y TBCE en estas células debido a los fenómenos constantes de polimerización y despolimerización de MTs que tienen lugar en ellas.

TBCD se localiza en los centriolos de las espermátidas y en los espermatozoides siendo su concentración mayor en el centriolo distal. TBCE ha sido localizado en la región pericentrosomal de los espermatozoides humanos y aunque el estudio que realizamos en tejido testicular humano no aportó resultados probablemente debido a que el tratamiento al que sometimos los tejidos para poder realizar la técnica de inmunomicroscopía modificara los epítomos que reconocía nuestro anticuerpo, si que podemos confirmar que ha sido localizado TBCE en la región pericentrosomal de las espermátidas de ratón en nuestros laboratorios (Tesis Carranza, 2010). Y nuestros resultados coinciden con los obtenidos por diferentes grupos (Cunningham y Kahn, 2008; López Fanarraga y colaboradores, 2010; Tesis Carranza, 2010) donde demuestran que tanto TBCD como TBCE a pesar de ser proteínas citosólica se pueden localizar también en los centrosomas y zonas pericentrosomales.

La localización centrosomal de estos TBCs, también ha sido descrita en los cuerpos basales de los cilios de las células endociliares de ratón que, al igual que los centriolos actúan como MTOC (López Fanarraga y col, 2010). Este resultado es lógico si tenemos en cuenta la gran semejanza que existe entre los cilios y flagelos ya que incluso hay varios autores que consideran que los flagelos y los cilios eucariotas son dos formas de la misma estructura celular formadas por MTs (Lindemann y col, 2010; Mizuno y col 2012; Konno y col, 2012)

Para que se forme el flagelo en las espermátidas alargadas, es necesario que tenga lugar la nucleación a partir de los cuerpos basales. Cunningham y Kahn (2008) han descrito la capacidad que tiene TBCD para reclutar estos complejos y otras proteínas (pericentrina por ejemplo) actuando como un adaptador entre los centriolos y los componentes PCM. El hecho de que TBCD se encuentre más concentrado en el centriolo distal de la espermátida podría estar relacionado con esta capacidad de TBCD, ya que es el centriolo que actúa de plantilla para la formación del axonema del flagelo.

En este proceso de formación del flagelo, también se necesita un aporte elevado de subunidades de α - y β - tubulina. Qin y col. (2004) basándose en sus resultados y en los de otros grupos (Jonson y Rosebaum, 1992; Piperno y col, 1996; Deane y col, 2001), proponen que es en la base del flagelo donde se acumulan las moléculas precursoras de los diferentes componentes del axonema y donde tiene lugar el preensamblaje de algunos de estos componentes antes de ser transportados a la cola del flagelo mediante el IFTs. Si esto es así, la presencia de TBCD y TBCE en la zona del centrosoma, podría ser debida a su participación en los procesos de polimerización de las subunidades de α - y β - tubulina que serían transportadas como pequeños fragmentos de MT o protofilamentos por el axonema a lo largo del flagelo en formación. Al igual que en las espermátidas, la localización centrosomal y pericentrosomal de TBCD y TBCE en el espermatozoide podría estar relacionada con el mismo proceso de preensamblaje de los heterodímeros de α - y β - tubulina que serían transportados como un heterodímero al axonema del flagelo para mantener su longitud.

Por otro lado, los diferentes componentes del axonema desensamblados en el extremo flagelar, van a ser transportados al cuerpo celular mediante IFTs retrógrado para posteriormente ser degradados (Qin, 2004). Parece lógico pensar que la presencia de TBCD y TBCE a lo largo del axonema del flagelo, podría estar relacionada con estos

procesos de desensamblaje de los MTs debido a la capacidad que tiene ambos de participar en los procesos de renovación de los MTs captando α - y β -tubulina del heterodímero, respectivamente.

Diferentes grupos investigadores (Huang y col, 2009; Lutz y Burk, 2006, Schermer y col, 2006) basándose en sus resultados obtenidos en diferentes especies y tipos celulares, proponen que alguno de los componentes del flagelo, entre ellos α -tubulina acetilada, son transportados al cuerpo celular para ser degradados a través de la ruta ubiquitina-proteosoma y que la unión de estas moléculas o estructuras de deshecho a ubiquitinas o a proteínas relacionadas sería la señal para que fueran reconocidas por el IFT retrogrado y transportadas al cuerpo basal para ser destruidas por el proteosoma.

Ha sido propuesto por Bartolini y cols, 2005 y Kortazar y col, 2007, la posibilidad de que el dominio UBL localizado en el extremo C-terminal de TBCE podría contribuir a la interacción de este cofactor con el proteosoma y mediar de esta manera en la degradación de α -tubulina participando en los fenómenos de preteostasis de la tubulina. De hecho existe una proteína muy similar a TBCE, denominada TBCEL (del término inglés, *cofactor E-like*), cuya sobre expresión induce la despolimerización masiva de los MTs celulares y la degradación de la α -tubulina *via* proteosoma (Bartolini y col, 2005; Keller y col, 2005). Y TBCD podría estar involucrado en la degradación de β -tubulina *via* la ruta ubiquitina-proteosoma a través de las repeticiones tipo armadillo que posee en su extremo N-terminal (Grynberg y col, 2003; Ju y col, 2007).

Esta vía de degradación de proteínas, debido a la localización subcelular de TBCD y TBCE también podría estar implicada en la reducción parcial que sufre el centriolo distal durante el proceso de elongación de las espermátidas (Barroso y col, 2009).

Mediante la realización de técnicas bioquímicas y de inmunomicroscopía en ovocitos humanos, al igual que hemos observado en espermatozoides, la concentración de TBCD y TBCE es proporcionalmente mayor en los ovocitos que en las células somáticas aunque en estas células la localización subcelular de TBCD y TBCE es citosólica siendo este resultado lógico ya que los ovocitos humanos carecen de centrosomas. Esta peculiaridad en las diferentes localizaciones subcelular de TBCE y TBCD ha sido observada en otras proteínas como por ejemplo la γ -tubulina que también

se encuentra localizada tanto en el citosol como en el centrosoma de las células somáticas (Moudjou y col, 1996).

Como resultado general, tanto TBCD como TBCE se localizan en los tres estadios de maduración ovocitaria (PI, MI y MII), formando acúmulos de mayor o menor tamaño en el citosol. La posición de ambos cofactores en el ooplasma presenta cambios en su distribución y tamaño dependiendo del estadio en el que se encuentre el ovocito e incluso dentro de la misma fase de maduración (Fig.R-16, R-17, R-19 y R-20). Y esto podría ser debido a que la formación de un ovocito maduro implica cambios no sólo a nivel del material genético (meiosis), sino también a nivel del citoplasma como por ejemplo el desplazamiento de ciertos orgánulos como las mitocondrias, RE, AG, etc. donde están implicados los MTs, y donde hay MTs hay TBCs así que no es de extrañar que estos cambios o modificaciones también afecten a la distribución o localización de TBCD y TBCE.

Para poder confirmar estas hipótesis, sería interesante en un futuro continuar con el estudio realizando trabajos que permitan estudiar la posible colocalización de TBCD y TBCE con otras proteínas u estructuras celulares en ovocitos. Ya que por ejemplo tal y como se ha descrito en la introducción, durante la maduración de los ovocitos, los MTs van a participar en el desplazamiento de las mitocondrias a aquellas zonas del ooplasma donde se necesite un aporte de ATP. También se ha observado en neuronas motoras que una de las localizaciones de TBCE se encuentra en la región cis del AG donde participa en el transporte de tubulinas a lo largo del axón (Schaefer y col, 2007). El AG puede actuar como centro de nucleación de MTs (Efimov y col, 2007; Rivero y col, 2009; Rios, 2014), debido a la capacidad que tiene de unirse a través de diferentes proteínas (AKAP450, CDK5Rap2, miomegalina, pericentrina,) a los complejos γ -TuRC y actuar de manera similar a un centrosoma. (Takahashi y col, 1999; Wang y col, 2010, Verde y col, 2001; Oddoux y col, 2013). Los MTs formados a partir de estas estructuras podrían estar implicados en el transporte de sustancias o moléculas a la membrana plasmática. En los ovocitos humanos, el AG por un lado modifica su posición en el citoplasma a medida que el ovocito va madurando y por otro lado exporta glicoproteínas a la ZP y da lugar a la formación de los gránulos corticales que se encuentran situados alrededor de la membrana plasmática. El transporte de estas moléculas o estructuras subcelulares desde el AG a la membrana plasmática o ZP del ovocito, podría ser similar

al transporte de los componentes del axón desde el AG a la punta del axón con la participación de TBCE.

A pesar de la localización citosólica difusa de ambos TBCs, en el caso de TBCD se aprecia un cierto patrón de distribución asociado al material genético dependiendo del estadio de maduración del ovocito. En los ovocitos en PI, TBCD se encuentra localizado muy próximo a la VG donde de acuerdo a otros estudios podría estar involucrado en el reclutamiento de pericentrina y γ -tubulina al centrosoma. Es posible que además tenga la capacidad de unirse a estas proteínas en el citosol sin inhibir la capacidad de nucleación de MTs de las mismas (Cunningham y Kahn, 2008; López Fanarraga y col, 2010). Este hecho podría explicar la localización de TBCD próxima a la VG, ya que en los ovocitos humanos, aunque la formación del huso meiótico es acentrosomal, se requiere la presencia del complejo γ -TuRC (Rios, 2014) para que tenga lugar la nucleación de los MTs. Tal y como se describe en la introducción, existe la posibilidad de que haya material centrosomal asociado a la membrana nuclear de la VG y estos elementos posteriormente podrían formar parte de los MTOCs, a partir de los cuales se formaría el huso meiótico una vez que la membrana nuclear se haya roto. La presencia de estructuras similares o parecidas a las que estamos proponiendo, han sido ya descritas en las células ependimales de ratón durante la ciliogénesis, donde se ha observado en el citoplasma la presencia de unas estructuras redondas de unas 0,3 μm en diámetro denominadas rosetas centriolares formadas por TBCD y γ - tubulina (López Fanarraga y col, 2010).

TBCD no sólo participa en el reclutamiento de proteínas al centrosoma sino que también está involucrado en la formación y ensamblaje del huso mitótico. Por este motivo, es probable que su presencia cerca o incluso en contacto con los cromosomas en los MI y MII pueda estar relacionada con su participación en los husos meióticos. Aunque se desconoce el mecanismo exacto que conduce a la formación de este huso acentriolar, se cree que intervienen MTOC y los cromosomas y esto coincide con la localización de TBCD.

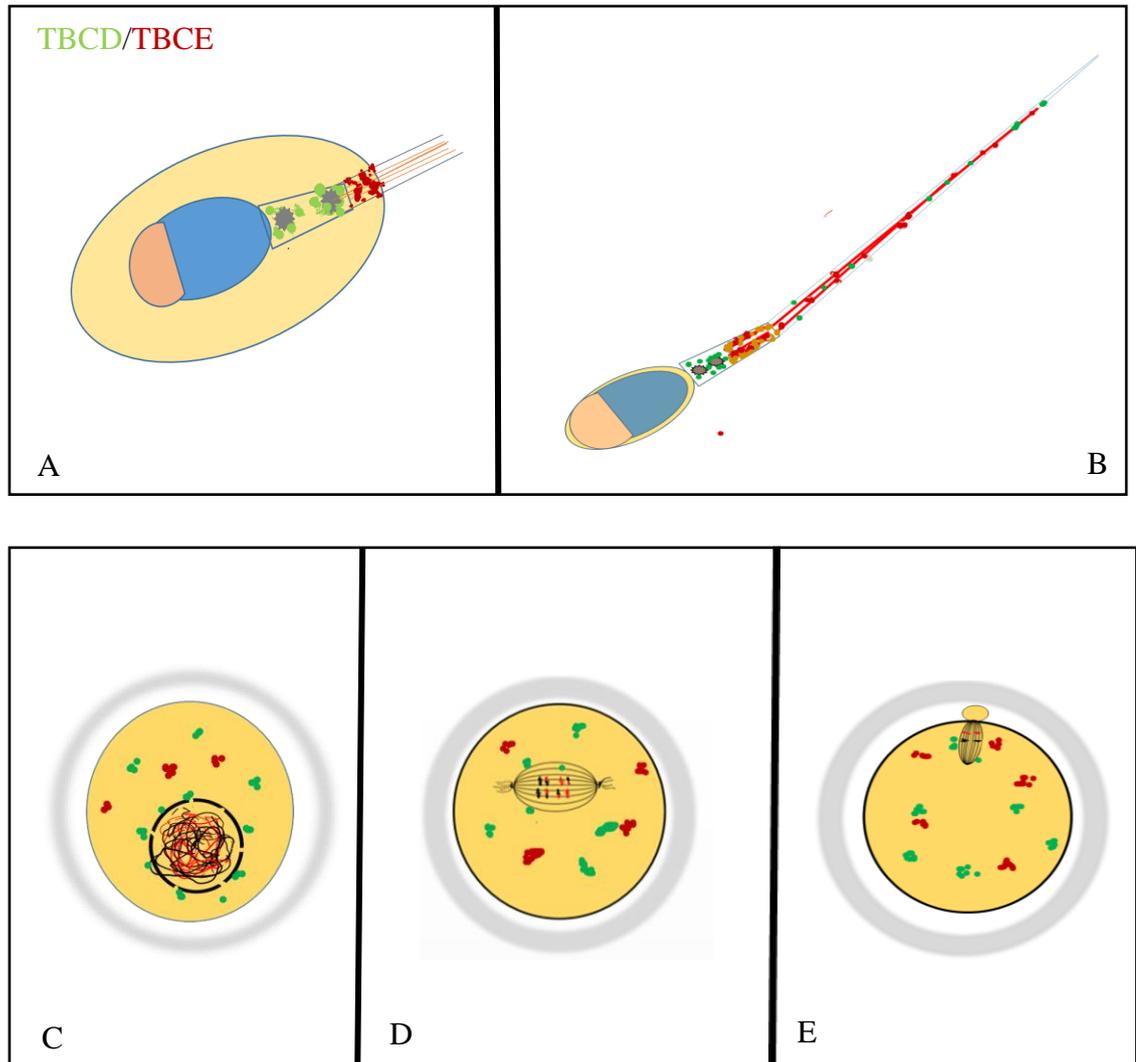


Fig.D-1: Esquema resumen de la localización subcelular de TBCD y TBCE en gametos humanos. A. Dibujo de una espermátida elongada donde se inicia la formación del flagelo. TBCD se localiza en los centrosomas y TBCE en la región pericentrosomal. B. Dibujo de un espermatozoide maduro donde TBCD y TBCE se encuentran en los centrosomas y en la región pericentrosomal respectivamente y en el flagelo. C., D., E. Figuras representativas de ovocitos en PI, MI y MII donde se aprecia la localización citoplasmática en forma de acúmulos de TBCD y TBCE y la localización de TBCD próxima al material genético en los tres estadios de maduración ovocitaria

Tal y como hemos comentado al inicio de la discusión, los MTs y por tanto los TBCs también están implicados en diferentes mecanismos celulares que participan en el proceso de fecundación y primeras divisiones celulares del embrión y aunque por razones legales y éticas no he podido continuar con nuestro estudio en ovocitos humanos fecundados, la evidencia de los estudios anteriores indican que tanto TBCD como TBCE están implicados en estos procesos.

Una vez que tiene lugar el contacto entre los gametos y en un periodo de tiempo relativamente corto (72 h) va a tener lugar la terminación de la meiosis por parte del ovocito, la descondensación de los pronúcleos y su desplazamiento dentro del citoplasma para poder juntarse y fusionarse, la creación del centrosoma del embrión y las tres divisiones mitóticas necesarias para que el embrión alcance el estadio de 6-8 células y adquiera la capacidad de activar su genoma. En casi todos estos procesos se requiere necesariamente la participación de una gran cantidad de MTs y por tanto es requisito imprescindible que haya tubulina en grandes cantidades. Hemos de recordar que basándonos en nuestros resultados (Fig. R-1) y los de otros grupos (Boiso y col, 2002; Mandelbaun y col, 2003; Chen y col, 2003; Li y col, 2006; Coticchio y col, 2013), es muy posible que la concentración de tubulina en los ovocitos sea muy pequeña, ya que es probable que posean una red microtubular muy escasa, constituida en su mayor parte por los MTs del huso meiótico en los MI y MII. Esto implicaría que la gran cantidad de tubulina que requiere por un lado el ovocito fecundado y por otro el embrión en sus primeros estadios de división va a ser traducida a partir de los ARNm que aportaría alguno de los gametos. La elevada síntesis de polipéptidos de α - y β -tubulina necesitara la presencia de los TBCs para que tenga lugar el plegamiento y ensamblaje del dímero de tubulina y este hecho justificaría los niveles elevados de TBCD y TBCE observados en los ovocitos mediante las diferentes técnicas empleadas.

Por otro lado, una vez que ha tenido lugar la entrada del espermatozoide en el ovocito y este último se activa finalizando su división meiótica, es posible que la presencia de TBCD y TBCE en el centrosoma del espermatozoide esté relacionado con la separación del centrosoma y el axonema del flagelo quedando los centriolos libres para que se forme a partir del centriolo proximal el áster de MTs responsable de la aproximación de los pronúcleos masculinos y femeninos. Algo similar ha sido descrito en las células de mamíferos, donde es necesario que el cuerpo basal se separe del cilio

para que pueda iniciarse la mitosis ya que el centríolo contribuye a la formación del huso mitótico (Quarmby y Paker, 2005; Plonikova y col, 2008). El mecanismo de actuación de TBCD y TBCE sería el mismo que hemos propuesto anteriormente en la discusión para explicar la reducción parcial del centríolo distal durante la espermatogénesis y la despolimerización del extremo distal del axonema del flagelo del espermatozoide.

Tanto el ovocito como el espermatozoide van a participar en la formación del centrosoma del embrión, ya que los centríolos del espermatozoide se van a duplicar durante la formación del áster de MTs que atrae a los pronúcleos formando diplosomas y el ovocito contribuye con parte del material pericentriolar (Sathanathan, 1998) aportando gran cantidad de γ - tubulina. Es muy probable TBCD esté involucrado en este proceso ya que está implicado en los mecanismos de centríologénesis (López Fanarraga y col, 2010) y en el reclutamiento de los complejos γ -TuRC al centrosoma (Cunningham y Khan, 2008).

Para completar el estudio y confirmar algunas de la hipótesis expuestas anteriormente, se realizaron estudios bioquímicos que confirmaron la presencia de los ARNm de los TBCs en los gametos humanos. Estos resultados coinciden con los de grupos investigadores que han confirmado la presencia de los ARNm de diferentes proteínas en espermatozoides como en ovocitos (Ostermeier y col, 2002; Barroso y col, 2009; Gosden y Lee, 2010). De hecho, ha sido descrita por García-Herrero (2011) la existencia de diferencias en los perfiles de ARNm entre los espermatozoides de pacientes que embarazan y los que no mediante la técnica de ICSI.

La presencia de los ARNm de los TBCs en ambos gametos podría deberse a dos motivos: por un lado, durante la formación de los gametos, tiene lugar la síntesis de gran cantidad de ARNm, antes de que tenga lugar su silenciamiento durante la PI, quedando la regulación de la expresión génica bajo el control de la síntesis de proteínas en vez de la transcripción (Gosden y Lee, 2010). Aunque algunos ARNm son almacenados para su posterior uso durante el proceso de fecundación y otros son selectivamente degenerados de forma dirigida (Stitzel y Seydoux, 2007), una gran mayoría de ellos son traducidos a proteínas durante la maduración de estas células. Por lo tanto, parece lógico pensar, que es muy probable que parte de los ARNm de los TBCs vayan a ser traducidos a proteínas durante la maduración de los gametos, ya que

dicho proceso requiere de grandes cambios en la red de MTs que implican procesos de polimerización y despolimerización de las subunidades de α - y β -tubulina donde es imprescindible la presencia de los TBCs. Para poder confirmar esta hipótesis, sería necesario en un futuro realizar estudios de RT-PCR cuantitativos que nos permitan detectar variaciones en las concentraciones de los ARNm de los TBCs en los diferentes estadios de maduración de los gametos.

Por otro lado, ha sido propuesto por diferentes autores, que los ARNm almacenados en los gametos podrían ser aportados al embrión por estas células, siendo imprescindibles en las primeras divisiones embrionarias (Picton y col, 1998; Ostermeier y col, 2004; Gosden y Lee, 2010) ya que la activación del genoma embrionario humano no tiene lugar hasta el estadio de 6-8 células y para poder alcanzar esta fase va a ser necesaria la participación de los MTs en la formación del áster, husos mitóticos de las primeras divisiones embrionarias, redistribución de orgánulos, procesos de centriologénesis etc. La presencia de los ARNm de los TBCs en ambos gametos, nos indica que es muy probable que los TBCs necesarios para llevar a cabo la correcta asociación entre α y β -tubulina necesaria para la formación de MTs, se sinteticen a partir de los ARNm aportados por los gametos al embrión.

Una vez descrita la presencia de los ARNm de los TBCs en los gametos humanos, es importante señalar que los resultados obtenidos durante el estudio muestran diferencias entre los ARNm que posee cada gameto ya que, por un lado los espermatozoides carecen de ARNm para TBCD y TBCE mientras que en los ovocitos aparecen dichos ARNm pero, por el contrario, los espermatozoides presentan el ARNm para β -tubulina mientras que los ovocitos carecen de él. Estas diferencias en las poblaciones de ARNm podría deberse a que tanto los ovocitos como los espermatozoides, al ser células haploides altamente especializadas, tienen la capacidad de fusionarse entre sí para crear un embrión viable y, para ello, cada uno de estos gametos va a aportar diferentes elementos al embrión como por ejemplo los centriolos, que son aportados por los espermatozoide o las mitocondrias que las aportan los ovocitos. El grupo de Ostermeier (2004) sugirió que algo similar ocurre con los ARNm ya que, es posible que exista una cierta complementariedad entre los ARNm aportados por cada gameto. Es decir, el espermatozoide aportaría al ovocito ARNm que serían necesarios para el cigoto pero no para el ovocito y por este motivo el ovocito carecería

de ellos y viceversa. Por ejemplo, ha sido descrito que los espermatozoides aportan al ovocito ARNm de la proteína clusterina y pequeños ARN de interferencia implicados en la interacción célula-célula, célula-sustrato, transporte de lípidos, formación pronúcleos, activación ovocitaria, transición entre el genoma materno y el embrionario etc. (Osteermeier y col, 2004).

Tal y como se ha comentado anteriormente, hemos detectado la presencia de ARNm para β -tubulina en espermatozoides pero no en ovocitos, y este resultado nos obliga a replantearnos nuestras hipótesis iniciales en las que pensábamos que el ovocito aportaba ARNm de tubulinas al embrión. Este hecho podría ser debido a dos causas: por un lado, el ovocito podría tener suficiente β -tubulina para llevar a cabo su proceso de formación y maduración y por este motivo no contiene ARNm para β -tubulinas. En ese sentido, se sabe que el momento y el patrón de la síntesis de ARNm en el ovocito no necesariamente coincide con la traducción a una proteína activa (Picton et al., 1998), por ejemplo se ha visto que el MPF es expresado mucho antes de que los ovocitos sean competentes para realizar la meiosis, la enzima lactato deshidrogenasa está presente en cantidades muy superiores a las requeridas para llevar a cabo el metabolismo de los carbohidratos (Gosden y Lee, 2010) y algo similar se ha observado con el receptor μ de opioides (del término inglés “ μ -opioid receptor”, OPRM1) (Agirregoitia y col, 2012) cuyo ARNm no está presente en los ovocitos. Pensamos que algo similar puede estar ocurriendo con las tubulinas en los ovocitos y por este motivo no detectamos sus ARNm. Es posible que el ovocito contenga la β -tubulina suficiente para poder madurar pero que degrade su ARNm porque no le es necesario y que el espermatozoide aporte al ovocito en el momento de la fecundación los ARNm que darán lugar a las β -tubulina necesarias en las primeras divisiones embrionarias ya que nuestros resultados confirman la presencia de ARNm para β -tubulina. De igual manera, el ovocitos aportaría los ARNm de los cofactores TBCD y TBCE en esas primeras etapas donde el genoma del embrión es todavía inactivo.

Una vez comprobada la importancia de los TBCs en los gametos humanos, decidimos realizar estudios genéticos en pacientes de la URA. La finalidad del estudio era detectar la existencia de alguna posible mutación, polimorfismo o variación en las secuencias de genéticas de los TBCs que pudieran dar origen a proteínas mutantes relacionadas con problemas de fertilidad. En el estudio realizado, no encontramos

ningún polimorfismo directamente asociado a problemas de fertilidad pero sería importante hacer dos puntualizaciones. Por un lado fuimos demasiado conservadores a la hora de seleccionar los SNPs a estudiar, ya que estos fueron elegidos dentro de las zonas más conservadas entre diferente especies con la intención de detectar cambios importantes en la secuencias de los TBCs que pudieran estar ligados a patologías. Como es sabido el grado de conservación de las cadenas polipeptídicas de las proteínas a lo largo de la evolución es en general proporcional al grado de importancia tanto estructural como funcional de los correspondientes aminoácidos y por lo tanto variaciones en estas zonas estarían ligadas a alteraciones muy graves (ej. El síndrome de Sanjad-Sakati HRD) e incluso puede que ni siquiera fueran compatibles con la vida, por lo que es muy probable que las personas portadoras de estas alteraciones no se sometieran nunca a tratamientos de reproducción asistida.

Por otro lado los *tagging* SNPs tampoco aportaron ninguna información relevante aunque hay que señalar que nuestra muestra era muy pequeña para este tipo de estudio o análisis y por lo tanto no se puede considerar concluyentes nuestros resultados.

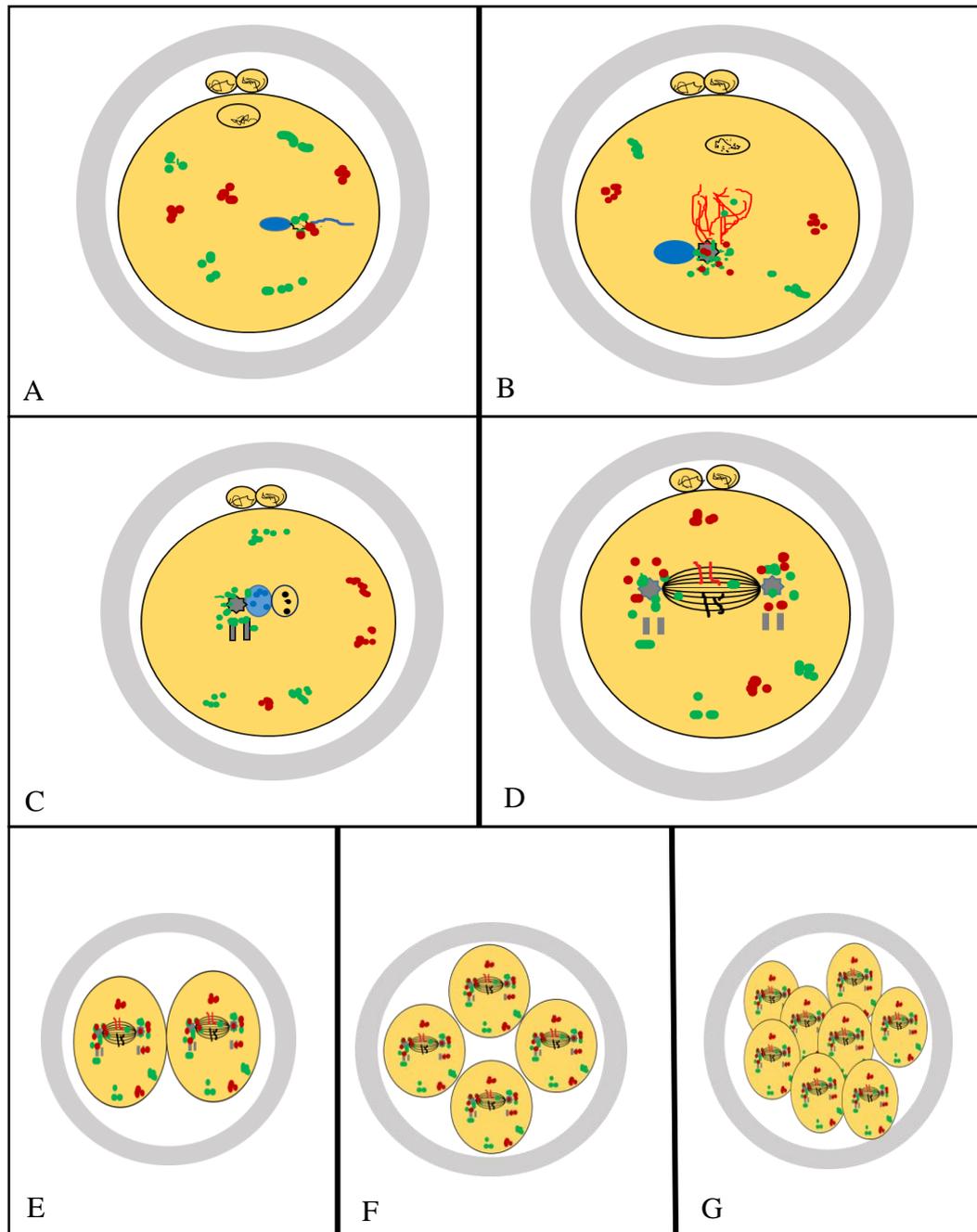


Fig.D-2: Predicción basada en los resultados que tenemos de las posibles funciones y localizaciones subcelulares de TBCD y TBCE en el proceso de fecundación y primeras divisiones celulares basándonos en los resultados obtenidos. A. Esquema de un ovocito en MII fecundado por un espermatozoide. La presencia de TBCD y TBCE en la región centrosomal del espermatozoide podría deberse a su participación en la separación de los restos del flagelo del centrosoma para que se inicie la formación del áster de MTs donde también estarían involucrados los TBCs. B. El áster de MTs es el responsable de la aproximación de los PNs masculino y femenino. C. A continuación se produce la duplicación de los centriolos masculinos donde TBCD podría estar involucrado ya que en las células somáticas está implicado en el proceso de centriologénesis. D. Se observa la organización del primer huso mitótico donde se ha comprobado que en las células somáticas TBCD está implicado en su formación y ensamblaje. E., F., G. Esquemas representativos de las primeras divisiones embrionarias hasta el estadio de 8 células. La activación del genoma del embrión humano, tiene lugar cuando el embrión alcanza el estadio de 6 a 8 células. Hasta llegar a ese punto, se abastece de las proteínas y ARNs heredados de los gametos. Tanto los TBCs del ovocito como los ARNs de los TBCs aportados por ambos gametos, van a participar en las primeras divisiones celulares en la formación de los husos mitóticos, centriologénesis y reordenación y distribución de los orgánulos celulares entre las blastómeras del embrión. (C y D. son figuras modificadas de Sathananthan, 1998)

VIII CONCLUSIONES

1. Tanto el cofactor de la tubulina D como el cofactor de la tubulina E, se encuentran presentes en los gametos humanos y su concentración es mayor que en las células somáticas.
2. En los ovocitos, las concentraciones de los cofactores de la tubulina D y E son mayor que la de tubulina.
3. En las espermátidas el cofactor de la tubulina D, se localiza en los centriolos siendo su concentración mayor en el centriolo distal.
4. En los espermatozoides de eyaculado, el cofactor de la tubulina D está presente en los centriolos y a lo largo del flagelo, siendo su concentración mayor en el centriolo distal.
5. En los espermatozoides maduros, el cofactor de la tubulina E se encuentra localizado en la zona pericentrosomal y a lo largo del flagelo.
6. En los diferentes estadios de maduración de los ovocitos, VG, MI y MII, tanto el cofactor de la tubulina como el cofactor de la tubulina D se encuentran localizados en el citoplasma celular formando cúmulos de diferentes tamaños.
7. En los ovocitos, la localización de TBCD en el citosol podría estar asociada a un patrón de determinado dependiendo del estadio de maduración.
8. En los ovocitos en profase I, el cofactor de la tubulina D tiende a ubicarse en localizaciones muy próximas o incluso en contacto con la vesícula germinal.
9. En los MI y MII, parte de los acúmulos del cofactor de la tubulina D, se encuentran muy próximos o incluso en contacto con los cromosomas.
10. TBCE, presenta una distribución citosólica difusa y al contrario que TBCD, no parece estar asociada a ningún patrón característico de distribución dependiendo del estadio de maduración de los ovocitos.

11. La presencia de los ARNm de los diferentes cofactores de la tubulina en los gametos humanos implica que son importantes en la maduración de los mismos.
12. La presencia de los ARNm de los diferentes cofactores de la tubulina en los gametos “maduros” sugiere que están implicados en los primeros estadios de desarrollo embrionario.

IX ESTUDIOS FUTUROS

Este estudio demuestra por primera vez la presencia de TBCE y TBCD en los gametos humanos y describe su localización subcelular: Las hipótesis expuestas durante la discusión, quedarían perfectamente demostradas, si en un futuro ampliáramos este trabajo con diferentes estudios tales como:

- realizar *western blot* con los diferentes estadios de maduración de los ovocitos para valorar si existen cambios en los niveles de estos TBCs en base al estadio de maduración.
- realizar técnicas de inmunomicroscopía para determinar la posible colocalización de TBCD y TBCE con otras estructuras utilizando diferentes marcadores.
- continuar con el estudio de inmunodetección TBCD y TBCE en ovocitos fecundados y embriones procedentes de otras especies animales para evitar problemas legales.
- aunque TBCD y TBCE parecen ser los TBCs más importantes ya que poseen la capacidad de asociarse al dímero de tubulina y disociarlo por ellos mismos, sería importante realizar el mismo estudio con el resto de los TBCs, para poder obtener la imagen completa de todo el proceso.
- en cuanto al estudio de SNPs, habría que ampliar la población de estudio y seleccionar los SNPs a estudiar utilizando secuencias más detalladas y menos conservativos que se hayan descrito en los últimos años.
- en caso de encontrar en los estudios de polimorfismos algún tipo de alteración relevante, habría que producir la variante alélica de forma recombinante para estudiar su función *in vitro* e *in vivo*.
- realizar PCR para valorar la presencia del ARNm de α -tubulina en los gametos y hacer PCRs cuantitativas para determinar la proporción de cada uno de los ARNm y en los diferentes estadios madurativos de los ovocitos.

•

X BIBLIOGRAFIA

Agirregoitia, E., Peralta, L., Mendoza, R., Expósito, A., Diaz Ereño, E., Matorras, R., Agirregoitia. (2012). Expression and localization of opioid receptors during the maturation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine online*, 24: 550-557.

Albertini, D., Combelles, C.M.H., Benecchi, E., Carabatsos, M.J. (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*; 121: 647-653.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watsn, J.D. (1993). *Molecular Biology of the Cell*, Third. Garland Science.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watsn, J.D. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, Forth Garland Science.

Andres, K.H. (1969). Der Olfaktorische Saum der Katze. *Cell Tissue Res.*; 96: 250-274.

Archer, J.E., Vega, L.R., Solomon, F. (1995). Rbl2p, a yeast protein that binds to beta-tubulin and participates in microtubule function in vivo. *Cell*; 82(3): 425-434.

Amos, L. A., Baker, T. S. (1979). The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature*, 279: 607-612.

Austin, C. (1982). The eggs. En *Reproduction in mammals*, vol 1. Cambridge University Press; 1: 46-62.

Bachvarova, R., De Leon, V., Johnson, A., Kaplan, G., Paynton, B.V. (1985). Changes in total RNA, polyadenylated RNA and Actin RNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol.*; 108(2): 325-331.

Baker, T.G., Franchi, L.L. (1967). The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *J. Cell Sci.*; 2: 213-224.

Ballescá, J.L. Fisiología Masculina. (2003). Testículo y gametogénesis. Regulación funcional testicular. Glándulas accesorias sexuales masculinas. La eyaculación. El eyaculado y composición. En Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción. Tomo 1. Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A; p101-108.

Bao, J., Wu, Q., Song, R., Jie, Z., Zheng, H., Xu, C., Yan, W. (2011). RANBP17 is localized to the XY body of spermatocytes and interacts with SPEM1 on the manchette of elongating spermatids. *Mol. Cell Endocrinol.*; 333: 134-142.

Bao, J., Zhang, J., Zheng, H., Xu, C., Yan, W. (2010). UBQLN1 interacts with SPEM1 and participates in spermiogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.*; 327: 89-97.

Bartolini, F., Tian, G., Piehl, M., Cassimeris, L., Lewis, S. A., Cowan, N. J. (2005). Identification of a novel tubulin-destabilizing protein related to the chaperone cofactor E. *J. Cell Sci.*; 118: 1197-1207.

Barri, P.N., Gallinelli, A., Coroleu, B., Parera, N., Fenollera, I., Gallostra, I. y col. (1998). Management of poor responders. In vitro Fertilization and Assisted Reproduction. Proceedings of the 10th World Congress of in vitro Fertilization and Assisted Reproduction. Bolonia: Monduzzi Editore; p. 265-76.

Barri P. Indications and results of oocyte donation in Spain. (2005). *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*; 34(7 Pt 2): 5545-5547.

Barroso, G., Valdespin, C., Vega, E., Kershenovich, R., Avila, R., Avendaño, C., Oehninger, S. (2009). Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertility & Sterility*, 92(3): 835-848.

Battaglia, D.E., Klein, N.A., Soules, M.R. (1996). Changes in centrosomal domains during meiotic maturation in the human oocyte. *Molecular Human Reproduction*; 2(11): 845-851.

Bhamidipati, A., Lewis, S. A., Cowan, N. J. (2000). ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin. *J. Cell Biol.*; 149: 1087-1096.

Bellido, J. (2006). Tesis: Expresión, purificación, localización y silenciamiento génico de los cofactores de la β -tubulina: TBCA, TBCD y ARL2. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria; 1-137.

Bergen, L. G., Borisy, G. G. (1980). Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J. Cell Biol.*; 84: 141-150.

Berruti, G, Paiardi, C. (2011). Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*; 1(2): 95-98.

Bivi, N., Romanello, M., Harrison, R., Clarke, I., Hoyle, D.C., Moro, L., Ortolani, F., Bonetti, A., Quadrifoglio, F., Tell, G., Delneri, D. (2009). Identification of secondary targets of N-containing bisphosphonates in mammalian cells via parallel competition analysis of the barcoded yeast deletion collection. *Genome Biol.*; 10:R93.

Blagden, S.P., Glover, D.M. (2003). Polar expeditions-provisioning the centrosome for mitosis. *Nature Cell Biology*; 5: 505-511.

Blanco, J., Fernández, S., Rodrigo, L. (2012). Bases genéticas de la infertilidad masculina. En Curso on line: Aplicaciones de la genética en reproducción Asistida. *ASEBIR*; 1-58.

Bloodgood, R.A. (2010). Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia. *Journal of Cell Science*; 123(4): 505-509.

Bommel, H., Xie, G., Rossoll, W., Wiese, S., Jablonka, S., Boehm, T., Sendtner, M. (2002). Missense mutation in the tubulin-specific chaperone E (TbcE) gene in the mouse mutant progressive motor neuropathy, a model of human motoneuron disease. *J. Cell Biol.*; 159: 563-569.

Bond, D. Chandley, A.C. (1983). Aneuploidy, en: Oxford Monographs on Medical genetics, Oxford University Press, Oxford; 198.

Bornens, M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*; 14(1): 25-34.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*; 72: 248-254.

Browder, L. (1985). *Developmental biology: A comprehensive synthesis. Oogenesis.* New York: Plenum Press; vol. 1.

Brunet, S., Verlhac, M.H. (2011). Positioning to get out meiosis: the asymetry of cell division. *Human Reproduction Update*; 17(1): 68-75.

Buffone, M. G., Ijiri, T. W., Cao, W., Merdiushev, T., Aghajanian, H. K., Gerton, G. L. (2013). Heads or tails?. Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol Reprod Dev.*; 79(1): 4-18.

Burghoorn, J., Dekker, M.P., Rademakers, S., De Jong, T., Willemsen, R., Jansen, G. (2007). Mutation of the MAP kinase DYF-5 affects docking and undocking of kinesin-2 motors and reduces their speed in the cilia of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104: 7157-62.

Campo, R., Fontalba, A., Sanchez, L. M., Zabala, J. C. (1994). A 14 kDa release factor is involved in GTP-dependent beta-tubulin folding. *FEBS Lett.*; 353: 162-166.

Caplow, M.; Ruhlen, R., Shanks, J. (1994). The free energy for hydrolysis of a microtubule-bound nucleotide triphosphate is near zero: all of the free energy for hydrolysis is stored in the microtubule lattice. *J Cell Biol*; 127(3): 779-88.

Carlier, M., Pantaloni, D. (1981). Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry*; 20(7): 1918-24.

Carpenter, E. J., Huzil, J. T., Luduena, R. F., Tuszynski, J. A. (2006). Homology modeling of tubulin: influence predictions for microtubule's biophysical properties. *Eur. Biophys. J.*; 36: 35-43.

Carranza, G. (2010). Tesis: Proteómica funcional del cofactor TBCE. Patología molecular de los síndromes de Kenny-Caffey (AR-KCS) y Sanjad-Sakati (HRD). Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria; 1-235.

Carranza, G., Castaño, R., Fanarraga, M. L., Villegas, J. C., Gonçalves, J., Soares, H., Avila, J., Marenchino, M., Campos-Olivas, R., Zabala, J. C. (2013). Autoinhibition of TBCB regulates EB-1 mediated microtubule dynamics. *Cell Mol. Life Sci.*; 70: 357-371.

Caudron, M., Bunt, G., Bastiaens, P., Karsenti, E. (2005). Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science*; 309: 1373-1376.

Chang, P., Stearns, T. (2000). Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nat. Cell Biol.*; 2: 30-35.

Chang, R.J., Erickson, G.F. (2010). Folliculogenesis, Ovulation, and Luteogenesis. En: *Endocrinology*, Sixth edition, Saunders; 2290-2301.

Charbon, G., Cabeen, M.T., Jacobs-Wagner, C. (2009). Bacterial intermediate filaments: in vivo assembly, organization, and dynamics of crescentin. *Genes & development (Cold Spring Harbor Lab)*; 23(9): 1131.

Chatzimeletiou, K., Morrison, E.E., Prapas, N., Prapas, Y., Handyside, A.H. (2008). The centrosome and early embryogenesis: clinical insights. *RBM online*; 16(4): 485-491.

Chemes, H.E., Puigdomenech, E.T., Carizza, C., Brugo, Olmedo S., Zanchetti, F.y col. (1999). Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment. A human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod.*; 14: 1811-8.

Chemes, H., Alvared Sedo, C. (2012). Tales of the Tail and Sperm Head Aches. Changing concepts on the prognostic significance of spermpathologies affecting the head, neck and tail. *Asian Journal of Andrology*; 14: 14-23.

Chretien, D., Wade, R. H. (1991). New data on the microtubule surface lattice. *Biol Cell*; 71: 161-174.

Clermont, Y. (1966a). Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertility and Sterility*; 17: 705-721.

Clermont, Y. (1966b). Renewal of spermatogonia in man. *American Journal of Anatomy*; 118: 509-524.

Cleveland, D.W., Lopata, M.A., Sherline, P., Kirschner, M.W. (1981). Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs. *Cell*; 25: 537-546.

Clift, D., Schuh, M. (2013). Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Molecular Cell Biology*; 14:549-562.

Conti, M., Andersen, C.B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S.Y., Horner, K., Jin, C, Tsafiriri, A. (2002). Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 187:153-159.

Cunningham, L. A., Kahn, R. A. (2008). Cofactor D functions as a centrosomal protein and is required for the recruitment of the gamma-tubulin ring complex at centrosomes and organization of the mitotic spindle. *J. Biol. Chem.*; 283: 7155-7165.

Dawe, H.R., Farr, H., Gull, K. (2007). Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J. Cell Sci.*; 120: 7-15.

Deane, J.A., Cole, D.G., Seeley, E.S., Diener, D.R., Rosebaum, J.L. (2001). Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr. Biol.*; 11: 1586-1590.

Delattre, M., Gönczy, P. (2004). The arithmetic of centrosome biogenesis. *Journal of Cell Science*; 117: 1619-1629.

Ducibella, T. y col. (2002). Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca^{2+} oscillation number. *Dev. Biol.*; 250: 280-291.

Dumollard, R., Duchen, M., Sardet, C. (2006). Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Semin Cell Dev. Biol.*; 17: 314-323.

Dupuis-Williams, P., Fleury-Aubusson, A., De Loubresse, N. G., Geoffroy, H., Vayssie, L., Galvani, A., Espigat, A., Rossier, J. (2002). Functional role of epsilon-tubulin in the assembly of the centriolar microtubule scaffold. *J. Cell Biol.*; 158: 1183-1193.

Dutcher, S. K. (2003). Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr. Opin. Microbiol.*; 6: 634-640.

Eddy, E.M., Toshimori, K., O'Brien D.A. (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech.*; 61(1): 103-15.

Edson, M.A., Nagaraja, A.K., Matzuk, M.M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*; 30(6): 624-712.

Ehmcke, J., Schaltt, S. (2006). A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction*; 132(5): 673-80.

Efimov, A., Kharitonov, A., Efimova, N., Loncarek, J., Miller, P.M., Andreyeva, N., Gleeson, P., Galjart, N., Maia, A.R., McLeod, I.X., Yates, J.R.III, Maiato, H., Khodjakov, A., Akhmanova, A., Kaverina, I. (2007). Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell*; 12: 917-930.

Eppig, J.J, Vivieros, M.M., Marin-Bivens, C., De La Fuente, R. (2004). Regulation of mammalian oocyte maturation. En *The Ovary*. Eds PCK Leung & EY Adashi. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 113-129.

Evans, L., Mitchison, T., Kirschner, M. (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J.Cell Biol*; 100: 1185-1191.

Fabregues, F., Balasch, J. (2009). Foliculogénesis: Papel de la FSH y LH. En *Fundamentos de reproducción*. Madrid: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (S.E.G.O); 23-28.

Fanarraga, M. L., Avila, J., Zabala, J. C. (1999a). Expression of unphosphorylated class III beta-tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation. *Eur.J.Neurosci*.; 11: 517-527.

Fanarraga, M. L., Parraga, M., Aloria, K., Del, Mazo J., Avila, J., Zabala, J. C. (1999b). Regulated expression of p14 (cofactor A) during spermatogenesis. *Cell Motil. Cytoskeleton*.; 43: 243-254.

Fanarraga, M.L., Villegas, J.C., Carranza, G., Castaño, R., Zabala, J.C. (2009). Tubulin cofactor B regulates microtubule densities during microglia transition to the reactive states. *Exp. Cell Res.*; 313: 535-541.

Fant X, Merdes A, Haren L. (2004). Cell and molecular biology of spindle poles and NuMA. *Int Rev Cytol.*; 238: 1-57.

Feierbach, B., Nogales, E., Downing, K. H., Stearns, T. (1999). Alf1p, a CLIP-170 domain-containing protein, is functionally and physically associated with alpha-tubulin. *J.Cell Biol.*; 144; 113-12.

Ferreira, E.M., Vireque, A.A., Adona, P.R., Meirelles, F.V., Ferriani, R.A., Navarro, P.A. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*; 71: 836-848.

Fisch, C., Dupuis-Williams, P. (2011). Ultrastructure of cilia and flagella- back to the future. *Biol.Cell.*; 103: 249-270.

FitzHarris, G., Marangos, P., Carroll, J. (2007). Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Dev Biol.*; 305:133-144.

Fitzpatrick, D.R. (2005). Transcriptional consequences of autosomal trisomy. Primary gene dose complex downstream effects. *Trends Genet.*; 21: 249-253.

Fleming, J. A., Vega, L. R., Solomon, F. (2000). Function of tubulin binding proteins in vivo. *Genetics*; 156: 69-80.

Fontalba, A., Paciucci, R., Avila, J., Zabala, J. C. (1993). Incorporation of tubulin subunits into dimers requires GTP hydrolysis. *J.Cell Sci.*; 106 (Pt 2): 627-632.

Fourest-Lieuvain, A., Peris, L., Gache, V., Garcia-Saez, I., Juillan-Binard, C., Lantez V., Job, D. (2006). Microtubule regulation in mitosis: Tubulin phosphorylation by the cyclin Dependent kinase Cdk-1. *Mol. Biol. Cell*; 17: 1041-1050.

Gao, Y., Melki, R.,Walden, P. D., Lewis, S. A. ,Ampe, C., Rommelaere, H.,Vandekerckhove, J. y Cowan, N. J. (1994). A novel cochaperonin that modulates the ATPase activity of cytoplasmic chaperonin. *J.Cell Biol.*; 125: 989-996.

García Caldés, M., Ponsa Arjona, I. (2003). Introducción a las bases celulares y genéticas de la gametogénesis femenina. En *Tratado de Ginecología, Obstetricia y medicina de la Reproducción*. Tomo 1. Madrid: Editorial Médica panamericana, S.A; 51-57.

García-Hevia, L., Fernández, F., Grávalos, C., Garciaj, A., Villegas, J.C., L Fanarraga, M. (2014). Nanotube interactions with microtubules: implications for cancer medicine.*Nanomedicine*; 9(10): 1581-1588.

Garcia-Herrero, S., Garrido, N., Martinez-Conejero, J.A., Pellicer, A., Meseguer, M. (2011). Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod. Biomed. Online*; 22(1): 25-36.

Gibbons, I.R., Rowe, A.J. (1965). Dynein: a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science*; 149: 424-426.

Gil, Salom, M., Bellver, J., Romero, J.L., Rossal, L.P., Gutiérrez, A., Escudero, E., Simón, C., Pellicer, A., Remohí, J. (2002). Espermatogénesis: Conceptos Básicos. En Remohi, J., Pellicer, A., Simón, C., Navarro J. *Reproducción Humana 2ª* Madrid: Mc Graw-Hill/Interamericana de España, S.A.U; p.273-278.

Gilchrist, R.B., Michelle, L., Thompson, J.G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human. Reprod. Update*; 14(2): 159-177.

Gilula, N.B., Satir, P. (1972). The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J. Cell Biol.*; 53: 494-509.

Gilula, N.B., Epstein, M.L., Beers, W.H. (1978). Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol.*; 78(1): 58-75.

Gonzalez-Garay, M.L., Cabral, F. (1996). Alpha-Tubulin limits its own synthesis: evidence for a mechanism involving translational repression. *J. Cell Biol.*; 135:1525-1534.

Gosden, R., Krapez, J., Briggs, D. (1997). Growth and development of the mammalian oocyte. *BioEssays*; 19(10): 875-882.

Gosden, R., Lee, B. (2010). Portrait of an oocyte: our obscure origin. *The Journal of Clinical Investigation*; 120 (4): 973-981.

Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*; 17: 121-155.

Grynberg, M., Jaroszewski, L., Godzik, A. (2003). Domain analysis of the tubulin cofactor system: a model for tubulin folding and dimerization. *BMC Bioinformatics*; 4, 46.

Guasch, A., Aloria, K., Perez, R., Ávila, J., Zabala, J. C., Coll, M. (2002). Three-dimensional structure of human tubulin chaperone cofactor A. *J.Mol.Biol.*; 318: 1139-1149.

Guerin, P., El Moutassim, S., Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Human Reprod Update*; 7:175-189.

Guyton, A.C., Hall, J.E. (1996). Reproductive and hormonal functions of the male (and the pineal gland. En Guyton, A.C., Hall J.E. *Textbook of Medical Physiology 9^a* W.B.Saunders Company; p1003-1015.

Hammond, J.W., Huang, C.F., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G., Verhey, K.J. (2010). Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Mol. Biol. Cell.*; 21: 572-83.

Hassold, T., Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics*; 2: 280-291.

Hartshorne, G.M., Lyrakou, S., Hamoda, H., Oloto, E., Ghafari, F. (2009). Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection?. *Molecular Human Reproduction*; 15(12): 805-819.

Hirata, D., Masuda, H., Eddison, M., Toda, T. (1998). Essential role of tubulin-folding cofactor D in microtubule assembly and its association with microtubules in fission yeast. *EMBO J.*; 17: 658-666.

Holstein, A.F., Roosen-Runge, E.C. (1981). *Atlas of Human Spermatogenesis*. Berlin: Grose Verlag.

Horner, V.L. & Wolfner, M.F. (2008). Transitioning from egg to embryo: triggers and mechanisms of egg activation. *Dev. Dyn.*, 237: 527-544.

Howe, K., FitzHarris, G. (2013). Recent insights into spindle function in Mammalian oocyte and early embryos. *Biology of reproduction*; 89(3): 1-9.

Hoyt, M.A., Macke, J.P., Roberts, B.T., Geiser, J.R. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* PAC2 functions with CIN1, 2 and 4 in a pathway leading to normal microtubule stability. *Genetics*; 146: 849-857.

Huang, K., Diener, D.R., Rosebaum, J.L. (2009). The ubiquitin conjugation system is involved in the disassembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.*; 186(4): 601-613.

Huisman, G.J., Fauser, B.C., Eijkemans, M.J., Pieters, M.H. (2000). Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days in culture. *Fertil Steril.*; 73: 117-22.

Hunter, D., Anand-Ivell R., Danner, S., Ivell, R. (2012). Models of *in vitro* spermatogenesis. *Spermatogenesis*; 2(1): 1-12.

Hynes, R.O. (2009). The extracellular matrix not just pretty fibrils. *Science*; 27 (236): 1216-1219.

Inclán, Y.F., Nogales, E. (2000). Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of gamma-, delta- and epsilon-tubulin. *J. Cell Sci.*; 114: 413-422.

International HapMap Consortium. (2003). The International HapMap Project. *Nature*; 426: 789-794.

International HapMap Consortium. (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*; 437: 1299-1320.

International HapMap Consortium. (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*; 449: 851-861.

Janke, C., Bulinski, J.C. (2012). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature Rev.*; 12: 773-786.

Jansen R. (2000). Germline passage of mitochondria: quantitative considerations and possible embryological sequelae. *Human Reproduction*; 15 (Suppl 2): 112-128.

Jansen, R.P., Niessing D. (2012). Assembly of mRNA-protein complexes for directional mRNA transport in Eukaryote. An overview. *Current Protein and Peptide Science*, 13: 284-293.

Jiménez-Moreno, V., Fanarraga, M. L., Zabala, J.C., Villegas, J.C. (2010). TBCD en espermatogénesis. Poster presentado en el XXVIII Congreso Nacional de la SEF, Valencia.

Jin, S., Pan, L., Liu, Z., Wang, Q., Xu, Z., Zhang, Y. Q. (2009). Drosophila Tubulin-specific chaperone E functions at neuromuscular synapses and is required for microtubule network formation. *Development*; 136: 1571-1581.

Junqueira, L.C., Carneiro J., O.Kelley, R. (1995). *Basic Histology*. Eight Edition Appleton and Lange.

Kahn, R.A., Volpicelli-Daley, L., Bowzard, B., Shrivastava-Ranjan, P., Li, Y., Zhou, C., Cunningham, L. (2005). Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubuledynamics. *Biochem.Soc.Trans.*, 33: 1269-1272.

Kato, A., Nagata, Y., Todokoro, K. (2004). Delta-tubulin is a component of intercellular bridges and both the early and mature perinuclear rings during spermatogenesis. *Dev. Biol.*; 269: 196-205.

Keller, C.E., Lauring, B.P. (2005). Possible regulation of microtubules through destabilization of tubulin. *Trends Cell Biol.*; 15(11): 571-573.

Khan, A. O., Al-Assiri, A., Al-Mesfer, S. (2007). Ophthalmic features of hypoparathyroidismretardation-dysmorphism. *J.AAPOS.*; 11: 288-290.

Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E., Tres, L.L. (2003). Acroplaxome, an F-Actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Molecular Biology of the cell*; 14: 4628-4640.

Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E. and Tres, L.L. (2003b). The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet. Genome Res*; 103:337-344.

Kierszenbaum, A.L., Tres, L.L. (2004). The acrosoma-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol.*; 67 (4): 271-284.

Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E. y Tres, L.L. (2011). Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis*; 1(3): 221-230.

Kim, N.H., Funahashi, H., Prather, R.S. y col. (1996). Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol.Reprod.dev.*; 43: 248-255.

Kobe, B., Kajava, A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 11: 725-732.

Konno, A., Setou, M., Ikegami, K. (2012). Ciliary and flagellar structure and function-their regulations by posttranslational modifications of axonemal tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol.*; 294:133-70.

Kopczak, S. D., Haas, N. A., Hussey, P. J., Silflow, C. D., Snustad, D. P. (1992). The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed alpha-tubulin genes. *Plant Cell*; 4: 539-547.

Kortazar, D., Carranza, G., Bellido, J., Villegas, J. C., Fanarraga, M. L., Zabala, J. C. (2006). Native tubuline-folding cofactor E purified from baculovirus-infected Sf9 cells dissociates tubulin dimers. *Protein Expr Purifi.*, 49:196-202.

Kortazar, D., Fanarraga, M. L., Carranza, G., Bellido, J., Villegas, J. C., Avila, J., Zabala, J. C. (2007). Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation. *Exp.Cell Res.*; 313: 425-436.

Kraemer, J.A., Erb, M.L., Waddling, C.A., Montabana, E.A., Zher, E.A., Wang, H., Nguyen, K., Pham, D.S.L., Agard, D.A., Pogliano, J. (2012). A phage tubulin assembles dynamic filaments by an atypical mechanism to center viral DNA within the host cell. *Cell*; 149:1488-1499.

Krisher, R.L., Bavister, B.D. (1998). Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*; 59:103-114.

Kuh, G.F., Stockmann, M., Meyer-Ohlendorf, M., Linta, L., Proepper, C., Ludolph, A.C., Bockmann, J., Boeckers, T.M., Liebau S. (2012). Tubulin-binding cofactor B is a direct interaction partner of the dynactin subunit p150Glued. *Cell Tissue Res.*; 350 (1):13-26.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.

Lajoie-Mazenc, I., Tollon, Y., Detraves, C., Julian, M., Moisand, A., Gueth-Hallonet, C., Debec, A., Salles-Passador, I., Puget, A., Mazarguil, H., y col. (1994). Recruitment of antigenic gamma-tubulin during mitosis in animal cells: presence of gamma-tubulin in the mitotic spindle. *J.Cell Sci.*; 107 (Pt 10): 2825-2837.

Langman, J., Sadler, T.W. (2004). *Embriología médica*. Buenos Aires; Madrid: Editorial Médica Panamericana; p: 566.

Ledan, E., Polanski, Z., Terrent, M., Maro, B. (2001). Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev Biol.*; 232: 400-413.

Lewis, S. A., Lee, M. G., Cowan, N. J. (1985). Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J.Cell Biol.*; 101: 852-861.

Li, H., DeRosier D.J., Nicholson W.V., Nogales E., Downing K.H. (2002). Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure*; 10: 1317-28.

Li, S., Finley, J., Liu, Z. J., Qiu, S. H., Chen, H., Luan, C. H., Carson, M., Tsao, J., Johnson, Lin, D., Zhao, G., Thomas, J., Nagy, W., Sha, L.A., DeLucas, B., Wang, L.J., Luo, B.C. (2002b). M. Crystal structure of the cytoskeleton-associated protein glycine-rich (CAP-Gly) domain. *J.Biol.Chem.*, 277: 48596-48601.

Li, Y., M.D., Feng, H.L., Cao, Y.J., Zheng, G.J., Yang, Y., Mullen, S., Critser, J.K., Chen, Z.J. (2006). Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. *Fertility and Sterility*; 85(4): 827-832.

Lindemann, C.B., Lesich, K.A. (2010). Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *Journal of Cell Science*, 123: 519-528.

Liu, X.J. (2012). Polar body emission. *Cytoskeleton*, 69: 670-685.

Llosa, M., Aloria, K., Campo, R., Padilla, R., Avila, J., Sanchez-Pulido, L., Zabala, J.C. (1996). The β -tubulin monomer release factor (p14) has homology with a region of DnaJ protein. *FEBS Lett.*; 397: 283-289.

Lopez-Fanarraga, M., Carranza, G., Bellido, J., Kortazar, D., Villegas, J.C., Zabala, J.C. (2007). Tubulin cofactor B plays a role in the neuronal growth cone. *J.Neurochem.*; 100(6): 1680-1687.

Lopez-Fanarraga, M., Bellido, J., Jaén, C., Villegas, J.C., Zabala, J.C. (2010). TBCD links centriologenesi, spindle microtubule dynamics, and midbody abscission in human cells. *PloS ONE*; 5(1): 1-9.

Lopez-Fanarraga, M., Carranza, G., Castaño, R., Jiménez, V., Villegas, J.C., Zabala, J.C. (2010). Emerging roles for tubulin folding cofactors at the centrosome. *Communicative & Integrative biology*; 3(4): 306-307.

Loutradis, D., Kiapekou, E., Zapanti, E., y Antsaklis, A. (2006). Oocyte maturation in assisted reproductive techniques. *Ann.N.Y. Acad.Sci.*; 1092: 235-246.

Lutz, M.S., Burk, R.D. (2006). Primary cilium formation requires von hippellindau gene function in renal-derived cells. *Cancer Res.*; 66: 6903-6907.

Lytle, B.L., Peterson, F.C., Qiu, S.H., Luo, M., Zhao, Q., Markley, J.L. y Volkman, B.F. (2004). Solution structure of a ubiquitin-like domain from tubulin-binding cofactor B. *J.Biol.Chem.*; 279: 46787-46793.

Maddox, A.S., Azoury, J., Dumont, J. (2012). Polar body cytokinesis. *Cytoskeleton*; 69: 855-868.

Manandhar, G, Simerly, C, Schatten, G. (2000). Highly degenerated distal centrioles in rhesus and human spermatozoa. *Hum Reprod.*; 15: 256-63.

Mandelbaum, J., Anastasiou, O., Levy, R., Guérin, J.F., De Larouziere. V., Antoine, J.M. (2004). Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*; S17-S23.

Mandelkow, E.; E. Mandelkow, Milligan, R. (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol.*; 114(5): 977-91.

Mann, J.S., Lowther, K.M., Mehlmann, L.M. (2010). Reorganization of the endoplasmic reticulum and development of Ca²⁺ release mechanisms during meiotic maturation of human oocytes. *Biology of Reproduction*; 83: 578-583.

Marshall, W.F. (2007). What is the function of centrioles? *J Cell Biochem.*; 100: 916-22.

Martín-Benito, J., Boskovic, J., Gomez-Puertas, P., Carrascosa, J. L., Simons, C. T., Lewis, S. A., Bartolini, F., Cowan, N. J., Valpuesta, J. M. (2002). Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *EMBO J.*; 21: 6377-6386.

Martin, L., Fanarraga, M. L., Aloria, K., Zabala, J. C. (2000). Tubulin folding cofactor D is a microtubule destabilizing protein. *FEBS Lett.*; 470: 93-95.

Martín N., Jaubert J., Gounon P., Salido E., Haase G., Szatanik M., Guenet J.L. A (2002). Missense mutation in TBCE causes progressive motor neuropathy in mice. *Nat. Genet.*; 32: 443-447.

Matsumoto, A.M. (1996). Spermatogenesis. En: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks, Z. (eds). *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia; 360- 384.

Matthews, K. A., Rees, D. y Kaufman, T. C. (1993). A functionally specialized alpha-tubulin is required for oocyte meiosis and cleavage mitoses in *Drosophila*. *Development.*; 117: 977-991.

Mayor, T., Meraldi, P., Nivelá, Stierhof, Y.D., Nigg, E.A., Fry, A.M. (1999). Protein kinases in control of the centrosome cycle. *FEBS Lett.*; 452 (1-2): 92-95.

McElver, J.; D. Patton; M. Rumbaugh; C. Liu; L. J. Yang y D. Meinke: (2000). The TITAN5 gene of *Arabidopsis* encodes a protein related to the ADP ribosylation factor family of GTP binding proteins. *Plant Cell*; 12(8): 1379-92.

McIntosh, J.R., Euteneuer, U. (1984). Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and an evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. *J Cell Biol.*; 98: 525-533.

McKean, P.G, Vaughan, S., Gull, K. (2001). The extended tubulin superfamily. *Journal of Cell Science*; 114: 2723-2733.

McNally, F. J. y Vale, R. D. (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*, 75: 419-429.

Mehlmann, L.M., Terasaki, M., Jaff, L.A., Kline, D. (1995). Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol.*; 170: 607-615.

Mehlmann, L. (2005). Stop and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*; 130: 791-799.

Mehlmann, L.M. (2013). Losing Mom's message: requirement for DCP1A and DCP2 in the degradation of maternal transcript during oocyte maturation. *Biology of Reproduction*; 88(1): 10, 1-2.

Meistrich, M., Van Beek MEAB. (1993). Spermatogonial stem cells. En: Desjardins C, Ewing LL (eds) *Cell and molecular biology of the testis*. Oxford University Press, Oxford; 266-295.

Melki, R., Rommelaere, H., Leguy, R., Vandekerckhove, J., Ampe, C. (1996). Cofactor A is a molecular chaperone required for beta-tubulin folding: functional and structural characterization. *Biochemistry*; 35: 10422-10435.

Miao, Y-L., Sun, Q-Y., Zhang, X., Zhao, J-G., Zhao, M-T., Spate, L., Prather, R.S., Schatten, H. (2009). Centrosome abnormalities during porcine oocyte aging. *Environ Mol Mutagen*; 50(8): 666-671.

Minguez, Y., Pacheco, A., Giménez F., De Souza A.P y Muñoz J. (2002). Obtención, preparación y criopreservación de espermatozoides de testículo y epidídimo. En RemohiJ, Pellicer A, Simón C, Navarro, J. *Reproducción Humana*. 2ª de Madrid: Mc Grw-Hill/ Interamericana de España, S.A.U; 407-412.

Mitchison, T., Kirschner, M. (1984a). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*; 312: 237-242.

Mitchison, T., Kirschner, M. (1984b). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature*; 312: 232-237.

Monesi, V. (1962). Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *J. Cell Biol.*; 14:1-18.

Monzo, A., Romeu, M., Romeu, A. (2008). El ciclo ovárico. En *Tratado de reproducción humana para enfermería*. Editorial médica panamericana, Madrid; 25-33.

Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Chan, E.K., Schatten, G. (2000). Vesicular traffic and Golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: implications for acrosome architecture. *Biol. Reprod.*; 63: 89-98.

Moreno, R.D., Palomino, J., Schatten G. (2006). Assembly of spermatid acrosome depends on microtubule organization during mammalian spermiogenesis. *Developmental Biology*; 293: 218-227.

Moritz, M. Agard, D. (2001). A. Gamma-tubulin complexes and microtubule nucleation. *Curr. Opin. Struct. Biol.*; 11: 174-181.

Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M., Bornens, M. (1996). Gamma-Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *J. Cell Sci.*; 109: 875-887.

Murdoch, W. (2000). Proteolytic and celular death mechanisms in ovulatory ovarian ruptura. *Biol. Signals Recept.*; 9: 102-14.

Nam-Hyung, K., Hyung, K.C., Kwang-Yul, C., Kil, S.C. (1998). Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Human Reproduction*; 13(8): 2217-2222.

Navarro, I., Quintero, L.A., Jiménez-Moreno, V., Monzo, A., Santana, A.G., Monatañana, V., Romeu, A. (2001). Comparacion del porcentaje de fecundación y la calidad embrionaria tras la realización de FIC e ICSI en un mismo ciclo de tratamiento: estudio preliminar. *R. Iberoamericana de Fertilidad*, 18(2): 75-79.

Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A., Lowe, J. (1988). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nature Struct. Biol.*; 5451-458.

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., Downing, K.H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell*; 96(1): 79-88.

Nogales, E., Wang H.W. (2006). Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? *Curr. Opin. Cell Biol.*; 18:179-184.

Nolasco, S., Bellido, J., Goncalves, J., Zabala, J. C., Soares, H. (2005). Tubulin cofactor A gene silencing in mammalian cells induces changes in microtubule cytoskeleton, cell cycle arrest and cell death. *FEBS Lett.*; 579: 3515-3524.

Oakley, B. R., Oakley, C. E., Yoon, Y., Jung, M. K. (1990). Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*; 61: 1289-1301.

Oakley, C. E., Oakley, B. R. (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*; 338: 662-664.

Oosawa, F., Asakura, S. (1975). Thermodynamics of the polymerization of proteins. Academic Press, London.

Ostermeyer, G.C., Dix, D.J., Miller, D., Khatri, P., Krawetz, S.A. (2002). Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*; 363(9335): 772-777.

Ostermeyer, G.C., Miller, D., Huntriss, J.D., Diamond, M.P., Krawetz, S.A. (2004). Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, 429: 154.

Parvari, R., HersHKovitz, E., Grossman, N., Gorodischer, R., Loeys, B., Zecic, A., Mortier G., Gregory, S., Sharony, R., Kambouris, M., Sakati, N., Meyer, B.F., Al Aqeel, A.I., Al Humaidan, A.K., Al Zahrani, F., Al Sawaid, A., Al Othman, J., Diaz, G.A., Weiner, R., Khan, K.T., Gordon, R., Gelb, B.D. (2002). Mutation of TBCE causes hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism and autosomal recessive Kenny-Caffey syndrome. *Nat. Genet.*; 32: 448-452.

Palazzo, R.E., Vogel, J.M., Schnackenberg, B.J. (2000). Centrosome maturation. *Current Topic in Developmental Biology*; 49: 449-470.

Peralta, L. (2012). Tesis: Expresión y localización de los receptores opioides (δ , κ , μ) y los receptores cannabinoides (CB1, CB2) durante la reanudación de la meiosis en ovocitos humanos. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco; 1-166.

Perry, A., Verhac, M. (2008). Second meiotic arrest and exit in frog and mice. *EMBO Rep.*; 9: 246-251.

Phillips, B.T., Gassei, K., Orwig, K.E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B.*; 365: 1663-1678.

Pickett-Heaps, J.D. (1969). The evolution of the mitotic apparatus: an attempt at comparative ultrastructural cytology in dividing plant cells. *Cytobios*; 3: 257-280.

Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol.*; 145: 27-37.

Piko, L., Clegg, K.B. (1982). Quantitative changes in total RNA, total poly (A), and ribosomes in early mouse embryos. *Dev Biol.*; 89(2): 362-378.

Piperno, G., Mead, K., Henderson, H. (1996). Inner dynein arms but not outer dynein arms require the activity of kinesin homologue protein KHP1FLA10 to reach the distal part of the flagella in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.*; 133: 371-379.

Plonikova, O.V., Golemis, E.A., Pugacheva, E.N. (2008). Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer Res.*; 68: 2058-2061.

Pont, S.J., Robbins, J.M., Bird, T.M., Gibson, J.B., Cleves, M.A., Tilford, J.M., Aitken, M.E. (2006). Congenital malformation among liveborn infants with trisomies 18 and 13. *Am. J. Med. Genet. A.*; 140: 1749-1756.

Qin, H., Diener, R.D., Geimer, S., Cole, D.G., Rosembaum, J.L. (2004). Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *J. Cell Biol.*; 164: 255-266.

Quarmby, L.M., Parker, J.D. (2005). Cilia and the cell cycle?. *J. Cell Biol.*; 169: 707-710.

Radcliffe, P. A., Hirata, D., Vardy, L., Toda, T. (1999). Functional dissection and hierarchy of tubulin-folding cofactor homologues in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.*; 10: 2987-3001.

Radcliffe, P.A., Vardy, L., Toda, T. (2000). A conserved small GTP- binding protein Alp41 is essential for the cofactor-dependent biogenesis of microtubules in fission yeast. *FEBS Lett.*; 468: 84-88.

Radcliffe, P. A., Toda, T. (2000b). Characterisation of fission yeast alp11 mutants defines three functional domains within tubulin-folding cofactor B. *Mol. Gen. Genet.*; 263: 752-760.

Rios, R.S. (2014). The centrosome-Golgi apparatus nexus. *Phil. Trans. R. Soc. B.*; 369: 20130462.

Rivero, S., Cardenas, J., Bornens, M., Rios, R.M. (2009). Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *The EMBO Journal*; 28(8): 1016-1028.

Rivkin, E., Cullinan, E.B., Tres, L.L., Kierszenbaum, A.L. (1997). A protein associated with the manchette during rat spermiogenesis is encoded by a gene of the TBP-1-like subfamily with highly conserved ATPase and protease domains. *Mol. Reprod. Dev.*; 48: 77-89.

Rivkin, E., Kierszenbaum, A.L., Gil, M., Tres, L.L. (2009). Rnf19a, a ubiquitin protein ligase, and Psmc3, a component of the 26S proteasome, tether to the acrosome membranes and the head-tail coupling apparatus during rat spermatid development. *Dev. Dyn.*; 238: 1851-1861.

Rombauts, L., Suikkari, A.M., Mac Lachlan, V., Trounson, A.O., Healy, D.L. (1998). Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle. *Fertil Steril.*; 69: 665-669.

Rosenbaum, J. (2000). Cytoskeleton: Functions for tubulin modifications at last. *Curr. Biol.*; 10(21): 801-803.

Ruiz, F., Krzywicka, A., Klotz, C., Keller, A., Cohen, J., Koll, F., Balavoine, G., Beisson, J. (2000). The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in *Paramecium*, encodes a novel tubulin, eta-tubulin. *Curr. Biol.*; 10: 1451-1454.

Sanjad S., Sakati N., Abu-Osba Y. (1988). Congenital hypoparathyroidism with dysmorphic features: a new syndrome. *Pediatr Res.*; 23: 271-419.

Saskova, A., Solc, P., Baran, V., Kubelka, M., Schultz, R.M., Motlik, J. (2008). Aurora kinase A controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Cell Cycle*; 7: 2368-2376.

Sathananthan, A.H., Tatham, B., Dharmawardena, V., Grills, B., Lewis, I., Trouson, A. (1997). Inheritance of sperm centrioles and centrosomes in bovine embryos. *Arch. Androl.*; 38: 37-48.

Sathananthan, A.H. (1998). Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility. *Journal of Assisted and Genetics*; 15(3): 129-139.

Sato, M., Tochio, N., Koshiha, S., Inoue, M., Kigawa, T, Yokoyama, S. (2004). Solution structure of the C-terminal ubiquitin-like domain of mouse tubulin-specific chaperone E.PDB. 1WJN.

Schaefer, M.K.E., Schmalbruch, H., Buhler, E., Lopez, C., Martin, N., Guénet J-L., Haase, G. (2007). Progressive motor neuropathy: a critical role of the tubulin chaperone TBCE in axonal tubulin routing from the Golgi apparatus. *Neurobiology of Disease*; 27 (33): 8779-8789.

Schatten, H., Schatten, G., Mazia, D. y col. (1986). Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and sea urchin eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 83: 105-109.

Schatten, H., Sun, Y.Q. (2009). The role of centrosomes in mammalian fertilization and its significance for ICSI. *Molecular Human Reproduction*; 15(9): 531-538.

Schatten, H., Rawe, V.R., Sun, Q-J. (2012). Cytoskeletal architecture of human oocytes with focus on centrosomes and their significant role in fertilization. En: *Practical manual of in vitro fertilization*. Springer New York; 667-676.

Schatten, G. (1995). The centrosome and its mode of inheritance. The reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev. Biol.*; 165: 299-335.

Schermer, B., Ghenoiu, C., Bartram, M., Müller, R.U., Kotsis, F., Höhne, M., Kühn, W., Rapka, R., Nitschke, R., Zentgraf, H. y col. (2006). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein controls ciliogenesis by orienting microtubule growth. *J. Cell Biol.*; 175: 547-554.

Schindler, K., Schultz, R.M. (2009). The CDC14A phosphatase regulates oocyte maturation in mouse. *Cell Cycle*; 8: 1090-8.

Schlatt, S., Weinberger, G.F. (1994). Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testis. *Int J Androl.*; 17: 214-222.

Shao, X., Tarnasky, H.A., Lee, J.P., Oko, R., Van der Hoorn, F.A. (1999) Spag4, a novel sperm protein, binds outer dense-fiber protein Odf1 and localizes to microtubules of manchette and axoneme. *Dev. Biol.*; 211: 109-123.

Sellin, M.E., Holmfeldt, P., Stenmark, S., Gullberg, M. (2008). Global regulation of the interphase microtubule system by abundantly expressed Op18/Stathmin. *Mol. Biol. Cell*; 19: 2897-2906.

Serna, M. (2013). Tesis: Caracterización estructural de las chaperoninas TBCE y TBCB involucradas en la homeostasis de la tubulina alfa. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid; 1-230.

Simerly, C., Wu, G.J., Ord, T., Jones, J., Navara, C.S., Gerrity, M., Rinehart, J., Binor, Z., Schatten, G. (1995). The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organize center, in humans, and the implications for infertility. *Nat. Med.*; 1: 47-52.

Smrzka, O.W., Delgehr, N., Bornens, M. (2000). Tissue-specific expression and subcellular localization of mammalian delta-tubulin. *Curr. Biol.*; 10: 413-416.

Solc, P., Saskova, A., Baran, V., Kubelka, M., Schultz, R.M., Motlik, J. (2008). CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Dev Biol.*; 317: 260-9.

Speroff, L., Fritz, M.A. (2006). *Endocrinología ginecológica clínica y esterilidad*. Madrid: Wolters Kluwer Health España; p. 1332.

Sperry, A.O. (2012). The dynamic cytoskeleton of the developing male germ cell. *Biol. Cell*; 104: 297-305.

Steinborn, K., Maulbetsch, C., Priester, B., Trautmann, S., Pacher, T., Geiges, B., Kuttner, F., Lepiniec, L., Stierhof, Y. D., Schwarz, H., Jurgens, G., Mayer, U. (2002). The Arabidopsis PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes Dev.*, 2002, 16: 959-971.

Stitzel, M.L., Seydoux, G. (2007). Regulation of the oocyte-to-zygote- transition. *Science*, 316: 407-408.

Stojkovic, M., Machado, S.A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Goncalves, P.B., Wolf, E. (2001). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod.*; 64: 904–909.

Sui H., Downing K.H. (2010). Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. *Structure*, 18: 1022-31.

Sullivan, K.F., Cleveland, D.W. (1986). Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate β -tubulin polypeptide classes. *Proc.Natl. Acad.Sci.*; 83: 4327-4331.

Sun, Q.Y., Lai, L., Park, K.W., Kühholzer, B., Prather, R.S., Schatten, H. (2001). Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated proteins kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biol Reprod.*; 64: 879-89.

Surrey, E.S., Bower, J.A., Hill, D.M., Ramsey, J., Surrey, M.W. (1998). Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.*; 69: 419-24.

Swain, J.E., Pool, T.B. (2008). ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Human Reproduction Update*; 14(5): 431-446.

Tash, J.S., Means, A.R. (1982). Regulation of proteins phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol. Reprod.*; 26: 745-763.

Takahashi, M., Shibata, H., Shimakawa, M., Miyamoto, M., Mukai, H., Ono, Y. (1999). Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.*; 274:17 267–17 274.

Tereda, Y., Scatten, G., Hasegawa, H., Yaegashi, N. (2010). Essential roles of the sperm centrosome in human fertilization: developing the therapy for fertilization failure due to sperm centrosomal dysfunction. *Tohoku J. Exp. Med.*; 220: 247-258.

Thibault, C., Szollosi, D., Gerard M. (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr. Dev.*; 27(5): 865-896.

Tian, G., Vainberg, I.E., Tap, W.D., Lewis, S.A., Cowan, N.J. (1995). Quasi-native chaperonin-bound intermediates in facilitated protein folding. *J. Biol. Chem.*; 270: 23910-23913.

Tian, G., Huang, Y., Rommelaere, H., Vandekerckhove, J., Ampe, C., Cowan, N.J. (1996). Pathway leading to correctly folded beta-tubulin. *Cell*; 86: 287-296.

Tian, G., Lewis, S. A., Feierbach, B., Stearns, T., Rommelaere, H., Ampe, C., Cowan, N.J. (1997). Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *J. Cell Biol.*; 138: 821-832.

Tian, G., Huang, Y., Parvari, R., Díaz, G.A., Cowan, N.J. (2006). Cryptic out-of-frame translational initiation of TBCE rescues tubulin formation in compound heterozygous HRD. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 103: 13491-13496.

Tian, G., Thomas, S., Cowan, N.J. (2010). Effect of TBCD and its regulatory interactor Arl2 on tubulin and microtubule integrity. *Cytoskeleton*, 67(11): 706-714.

Tinley L.G., Bryan J., Bush D.J., Fujiwara K., Mooseker M.S., Murphy D.B., Snyder D.H. (1973). Microtubules: evidences for 13 protofilaments. *J.Cell Biol.*; 59:267-275.

Tres, L.L. and Kierszenbaum, A.L. (1996). Sak57, an acidic keratin initially present in the spermatid manchette before becoming a component of paraaxonemal structures of the developing tail. *Mol. Reprod. Dev.*; 44: 395-407.

Tokura, T., Noda, Y., Goto, Y., Mori, T. (1993). Sequential observations of mitochondrial distributions in mouse oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*; 10: 417-426.

Turner, R.M. (2003). Tales From the Tail: What Do We Really Know Review About Sperm Motility?. *J. Andrology*; 24: 790-803.

Upadhya, S. C., Hegde, A. N. (2003). A potential proteasome-interacting motif within the ubiquitin-like domain of parkin and other proteins. *Trends Biochem. Sci.* 28; 280-283.

Vadlamudi, R. K., Barnes, C. J., Rayala, S., Li, F., Balasenthil, S., Marcus, S., Goodson, H.V., Sahin, A. A., Kumar, (2005). R. p21-activated kinase 1 regulates microtubule dynamics byphosphorylating tubulin cofactor B. *Mol.Cell Biol.*; 25; 3726-3736.

Valiente, C. (2009). Tesina: Diseño de un chip de genotipado para el cribado de mutaciones patológicas en los genes de los cofactores de la tubulina. Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria.

Valiente, C. (2013). Diseño de un chip de genotipado. Cribado de mutaciones patológicas en los genes de los cofactores de la tubulina. Editorial Academica Española.

Van Blerkom, J, Runner, M.N. (1984). Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. *Am. J. Anat.*; 171: 335–355.

Van Blerkom J. (1991). Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*; 88: 5031-5035.

Van Blerkom, J., Davis, P., Merriam, J., Sinclair, J. (1995). Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum.Reprod.Update*; 1: 429-461.

Van Blerkom, J. (2004). Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction*; 128: 269-280.

Veeck, L.L., Zaninovic, N. (2003). *An atlas of human blastocysts*. New York, The Parthenon Publishing Group.

Verde, I., Pahlke, G., Salanova, M., Zhang, G., Wang, S., Coletti, D., Onuffer, J., Jin, S.L. Conti, M. (2001). Myo megalin is a novel protein of the Golgi/centrosome that interacts with a cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, 276:119189-11198.

Verhey, K.J., Gaertig, J. (2007). The tubulin code. *Cell Cycle*; 6: 2152-2160.

Villasante, A., Wang, D., Dobner, P., Dolph, P., Lewis, S. A., Cowan, N. J. (1986). Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isoforms: testis-specific expression of two sister genes. *Mol.Cell Biol.*; 6: 2409-2419.

Vogt, E., Kirsch-Volders, M., Parry, J., Eichenlaub-Ritter, U. (2008). Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat Res.*, 651: 14-29.

Voloshin, O., Gocheva, Y., Gutnick, M., Movshovich, N., Bakhrat, A., Baranes-Bachar, K., Bar-Zvi, D., parvari, R., Gheber, L., Raven, D. (2010). Tubuline chaperone E binds microtubules and proteosomes and protects against misfolded protein stress. *Cell Mol Life Sci.*; 67: 2025-2038.

Wang, D., Villasante, A., Lewis, S. A., Cowan, N. J. (1986). The mammalian beta-tubulin repertoire: hematopoietic expression of a novel, heterologous beta-tubulin isotype. *J.Cell Biol.*; 103: 1903-1910.

Wang, Q., Yin, S., Ai, J.S., Liang, C.G., Hou, Y., Chen, D.Y., y col. (2006). Histone deacetylation is required for orderly meiosis. *Cell Cycle*; 5: 766-74.

Wang, Z., Wu, T., Shi, L., Zhang, L., Zheng, W., Qu, J.Y., Niu, R., Qi, R.Z. (2010). Conserved motif of CDK5RAP2 mediates its localization to centrosomes and the Golgi complex. *J. Biol. Chem.*; 285(29): 22658-22 665.

Wassarman, P.M., Josefowicz, W.J. (1978). Oocytes development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *J Morph.*; 156(2): 209-236.

Wassarman, P.M., Albertini, D.F. (1997). The mammalian ovum. En Knobil, E y Neill, J.D. *The physiology of reproduction*. New York, Raven Press, 2ª Edición; 79-122.

Weisenberg, R. C. (1972). Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science*; 177: 1104-1105.

Westermann, S., Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature Rev.*; 4: 938-947.

Wittmann, T., Hyman, A., Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell. Biol.*; 3: E28-34.

Yin, S., Sun, X.F., Schatten, H., Sun, Q.Y. (2008). Molecular insights into mechanism regulating faithful chromosome separation in female meiosis. *Cell Cycle*; 7: 2997-3005.

Yu, Y., Dumollard, R., Rossbach, A., Lai, F.A., Swann, K. (2010). Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *Journal of Cellular Physiology*; 672-680.

Yutin, N., Koonin, E.V. (2012). Archeal origin of tubulin. *Biol.Direct.*; 7:10.

Zabala, J. C., Cowan, N. J. (1992). Tubulin dimer formation via the release of alpha- and betatubulin monomers from multimolecular complexes. *Cell Motil. Cytoskeleton*; 23: 222-230.

Zeleznik, A.J. (2004). Dynamics of primate follicular growth: a physiological perspective. In *The Ovary, 2nd*, Eds PCK Leung & EY Adashi. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 45-53.

Zhang, T., Li, S., Zhang, Y., Zhong, C., Lai, Z., Ding, J. (2009). Crystal structure of the ARL2-GTP-BART complex reveals a novel recognition and binding mode of small GTPase with effector. *Structure*; 17: 602-610.

Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B., Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*; 378; 578-583.

Zuccotti, M., Merico, V., Cecconi, S., Redi, C.A., Garagna, S. (2011). What does it take to make a developmentally competent mammalian egg?. *Human Reproduction Update*; 0(0): 1-16.